

In vivo Charakterisierung der Degeneration
dezellularisierter und nativer biologischer
Herzklappenprothesen im Niederdrucksystem

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

dem Rat der medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Adrian Laube

geboren am 27.05.1987

in Suhl

Gutachter:

PD Dr. med. Tudor Constantin Pörner, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, Universitätsklinikum Düsseldorf

Prof. Dr. med. Axel Linke, Herzzentrum Leipzig - Universitätsklinik

Tag der öffentlichen Verteidigung:

03. Mai 2016

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

- Lauten A., Laube A., Schubert H., Bischoff S., Nietzsche S., Horstkotter K., Poudel-Bochmann B., Franz M., Lichtenberg A., Figulla H.R., Akhyari P. (2014)

Transcatheter treatment of tricuspid regurgitation by caval valve implantation-experimental evaluation of decellularized tissue valves in central venous position. *Catheter Cardiovasc Interv: epub*

- Lauten A., Figulla H.R., Willich C., Laube A., Rademacher W., Schubert H., Bischoff S., Ferrari M. (2010)

Percutaneous caval stent valve implantation: investigation of an interventional approach for treatment of tricuspid regurgitation. *Eur Heart J Vol 31 1274-81*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Zusammenfassung | 1 |
| 1 Einleitung | 3 |
| <hr/> | |
| 1.1 Die Anatomie und Funktion der Trikuspidalklappe | 3 |
| 1.2 Pathophysiologie, Epidemiologie und Diagnostik der TI | 4 |
| 1.2.1 Pathophysiologie der TI | 4 |
| 1.2.1.1 Strukturelle TI | 4 |
| 1.2.1.2 Funktionelle TI | 5 |
| 1.2.2 Epidemiologie der TI | 6 |
| 1.2.3 Diagnostik der TI | 6 |
| 1.3 Etablierte Therapiekonzepte und experimentelle Therapie- verfahren der TI | 9 |
| 1.3.1 Konservative Behandlung | 9 |
| 1.3.2 Chirurgische Behandlung – Indikation und Methoden | 10 |
| 1.3.3 Behandlungsbedarf | 11 |
| 1.3.4 Präklinische und klinische Erfahrungen der interventionellen Behandlung | 13 |
| 1.4 Herzklappenprothesen – Eigenschaften und Unterschiede | 14 |
| 1.4.1 Anforderungen an eine „ideale“ Herzklappenprothese | 15 |
| 1.4.2 Tissue Engineering zur Herstellung von Herzklappen- prothesen | 16 |
| 1.5 Zielstellung der Arbeit | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 2 Material und Methoden | 18 |
| <hr/> | |
| 2.1 Herstellung der Klappenprothesen | 18 |
| 2.1.1 Beschreibung der Nahttechnik | 19 |
| 2.2 Versuchsdurchführung | 20 |
| 2.2.1 Studiendesign | 20 |
| 2.2.2 Narkose und perioperatives Management | 22 |
| 2.2.3 Rechtsherzkatheter und pulmonalarterielltes Banding | 23 |
| 2.2.4 Strukturelle Schädigung und Implantation der Herzklappenprothesen | 24 |
| 2.2.5 Chronische Versuchsphase und Explantation | 26 |
| 2.3 Auswertungsmethoden | 27 |
| 2.3.1 Von Kossa-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung | 27 |
| 2.3.2 Immunhistochemie | 28 |
| 2.3.3 Rasterelektronenmikroskopie | 29 |
| 2.3.4 Statistik | 30 |
| 3 Ergebnisse | 31 |
| <hr/> | |
| 3.1 Hämodynamik | 31 |
| 3.2 Makroskopische Ergebnisse | 33 |
| 3.3 Histologie | 34 |
| 3.3.1 Von Kossa-Färbung | 34 |
| 3.3.2 Movat-Pentachrom-Färbung | 35 |
| 3.4 Immunhistochemie | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5 Rasterelektronenmikroskopie | 39 |
| 4 Diskussion | 40 |
| <hr/> | |
| 4.1 Bewertung der hämodynamischen Effekte und der Haltbarkeit | 40 |
| 4.2 Schlussfolgerungen aus dem Vergleich der makroskopischen und mikroskopischen Ergebnisse | 41 |
| 4.3 Limitationen der Arbeit | 44 |
| 4.3.1 Pathophysiologische und anatomische Limitation des Modells | 44 |
| 4.3.2 Limitation des Dezellularisierungsprotokolls | 45 |
| 4.4 Einordnung der Ergebnisse in die Literatur | 46 |
| 4.5 Ausblick | 48 |
| 5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 51 |
| <hr/> | |
| 6 Literaturverzeichnis | 52 |
| <hr/> | |
| Anhang | 55 |
| Danksagung | 57 |
| Lebenslauf | 58 |
| Ehrenwörtliche Erklärung | 59 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| A. | Arteria |
| ACE | angiotensin-converting enzyme |
| α -SMA | alpha smooth muscle actin |
| ASS | Acetylsalizylsäure |
| AV | atrioventrikular |
| cm | Zentimeter |
| COPD | chronic obstructive pulmonary disease |
| CT | Computertomographie |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| Decel-TV | dezellularisierte Trikuspidalklappe |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| ECM | extracellular matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| F | French (Maßeinheit, 1F = 1/3mm) |
| GA | Glutaraldehyd |
| GA-TV | glutaraldehyd-fixierte Trikuspidalklappe |
| GAG | Glykosaminoglykane (= Mucopolysaccharide) |
| HAES | Hydroxyethylstärke |
| HI/CI | Herzindex/cardiac index (= HZV/m ² Körperoberfläche) |
| HF | Herzfrequenz |
| HZV | Herzzeitvolumen |
| I.U. | international units |
| IVC | inferior vena cava, untere Hohlvene |
| IVC-V | Vena cava inferior V-Welle |
| IVCP | inferior vena cava pressure |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| LN2 | flüssiger Stickstoff |
| LV | Linker Ventrikel, linksventrikulär |
| MAD | mittlerer arterieller Druck |
| min | Minute |

| | |
|------------------|--|
| mM | millimolar |
| mmHG | Millimeter Quecksilbersäule (1mmHG = 133,32Pa) |
| mmol/l | Millimol pro Liter |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| PAH | pulmonal-arterielle Hypertonie |
| PAP | pulmonary artery pressure (= Pulmonalarteriendruck) |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | phosphate buffered saline (= phosphatgepufferte Salzlösung) |
| RA | rechtes Atrium, rechtsatrial |
| RAP | right atrial pressure |
| RA-V | rechtsatriale V-Welle |
| RAO | Right Anterior Oblique, eine bestimmte Röntgenperspektive bei der Herzkatheteruntersuchung |
| RNA | ribonucleic acid (= RNS) |
| RV | rechter Ventrikel, rechtsventrikulär |
| RVSP | right ventrikular systolic pressure |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (= Natriumlaurylsulfat), ein Detergenz |
| SEM | scanning electron microscopy (Rasterelektronenmikroskopie) |
| SV | Schlagvolumen |
| SVC | superior vena cava, obere Hohlvene |
| TAVI | transcatheter aortic valve implantation |
| TEE | transösophageale Echokardiografie |
| TI | Trikuspidalklappeninsuffizienz |
| TTE | transthorakale Echokardiografie |
| Triton-X-100 | Octoxinol-9, ein Detergenz |
| V. | Vena |
| Vv. | Venae |
| vWF | Von-Willebrand-Faktor |
| ZVK | zentraler Venenkatheter |

Zusammenfassung

Ältere, multimorbide Patienten mit schwerer Trikuspidalklappeninsuffizienz stellen im klinischen Alltag eine therapeutische Herausforderung dar. Die konservativen Therapiemöglichkeiten sind limitiert. Bisher ist keine interventionelle Therapie auf diesem Gebiet im klinischen Alltag etabliert.

Der Klappenersatz mittels selbstexpandierender Klappenprothese in zentralvenöser Position hat in präklinischen Studien und Heilversuchen am Menschen erste gute Ergebnisse erzielt.

Die klinisch etablierten Materialien zum biologischen Herzklappenersatz weisen jedoch eine begrenzte Haltbarkeit durch Degeneration auf und limitieren das Langzeitergebnis. Die Dezellularisierung als ein Verfahren zur Herstellung langlebiger biologischer Klappenmaterialien stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Überwindung dieser Limitation dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion und Haltbarkeit von dezellularenisierten und glutaraldehyd-fixierten Herzklappenprothesen in zentralvenöser Position im Tiermodell der hochgradigen Trikuspidalklappeninsuffizienz zu vergleichen.

Dazu wurden zwei Herzklappenprothesen je Tier in 8 Tiere auf einem selbstexpandierenden Nitinol-Stent in die SVC und IVC implantiert. Bei 4 Tieren wurde Prothesen aus glutaraldehyd-fixiertem Perikard, bei weiteren 4 Tieren aus dezellularemisierten Perikard verwendet.

Nach einer Beobachtungsphase von 24 Wochen ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Die Implantation zentralvenöser Klappenprothesen ist auch im chronischen Tiermodell technisch möglich.
2. Die Implantation führte zu einer signifikanten hämodynamischen Verbesserung in beiden Gruppen.
3. Im Langzeitergebnis wiesen die Prothesen aus dezellularemisierten Perikard eine bessere Haltbarkeit auf.

Die Unterschiede zeigten sich sowohl auf hämodynamischer als auch auf histologischer Ebene. Die dezellularisierten Prothesen wiesen eine persistierende Verbesserung der Hämodynamik auf, was bei den glutaraldehydfixierten Prothesen nicht nachweisbar war. Histologisch zeigten diese dagegen eine ausgeprägte Sklerose und Degeneration.

Es ergeben sich deutliche Vorteile bei der Verwendung von dezellularisiertem Perikard, welches im Gegensatz zu dem herkömmlich benutzten GAfixierten Material Herzklappenprothesen ermöglicht, die wesentlich geringer zur Degeneration und Sklerosierung neigen und Ansätze einer Rezellularisierung zeigen.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion der Trikuspidalklappe

Die Trikuspidalklappe ist die atrioventrikuläre Klappe des rechten Ventrikels. Sie ist die erste Herzklappe, auf die das desoxygenierte Blut, von Vena cava superior und Vena cava inferior kommend, trifft und ist zwischen dem rechten Vorhof und dem rechten Ventrikel lokalisiert.

Die Trikuspidalklappe verfügt über drei Segel: septal, anterior und posterior. Das posteriore Segel ist dabei das kleinste, die beiden anderen Segel nehmen eine größere Öffnungsfläche ein.

Die Sehnenfäden setzen an den freien Klappenrändern an und ziehen von dort aus in Richtung Kammer zu den Papillarmuskeln. Diese sind meist in kleinen Gruppen organisiert, die wiederum aus noch kleineren Muskeln bestehen. Die Sehnenfäden können dabei auch segelübergreifend ansetzen.

Der Trikuspidalanulus ist ein Teil der fibrösen Bindegewebsplatte, welche die Vorhöfe von den Kammern kurz unter der sog. Ventilebene trennt. Er ist oval und nimmt im dilatierten Zustand eine runde Form an. Der Durchmesser beträgt beim gesunden Menschen durchschnittlich 3-3,5cm (Shiran and Sagie 2009).

Die Trikuspidalklappe umfasst die größte Öffnungsfläche aller vier im humanen Herz vorkommenden Klappen (Flachskampf 2007). Ihre Funktion wird durch ein Zusammenwirken von Druckänderungen auf beiden Seiten der Klappe und dem passiven Halteapparat gewährleistet.

Die Sehnenfäden verhindern ein Prolabieren der Segel in den Vorhof während der Systole, wenn die Klappe durch den Druckanstieg im Ventrikel geschlossen wird und eine positive Druckdifferenz zwischen Kammer und Vorhof herrscht. Ein angeborener oder erworbener Defekt im Bereich der Sehnenfäden oder Papillarmuskeln führt häufig durch einen Prolaps eines Segelsegmentes zu einer Insuffizienz der Klappe.

Durch die größere Öffnungsfläche und den niedrigeren Druck ist die Flussgeschwindigkeit des Blutes durch die Trikuspidalklappe niedriger als bei der Mitralklappe auf der linksventrikulären Seite. Der Anulus expan-

diert während der Diastole und verkleinert sich zu einer ovalen Form während der Systole (Tei, Pilgrim et al. 1982). In der dritten Ebene ist der Anulus nicht planar, sondern nimmt eine Sattelform ein, die dynamischen Änderungen während der Herzaktion unterliegt (Fukuda, Saracino et al. 2006).

1.2 Pathophysiologie, Epidemiologie und Diagnostik der TI

1.2.1 Pathophysiologie der TI

Die Trikuspidalklappeninsuffizienz (TI) ist eine Schlussunfähigkeit in der Systole, die mit einem Rückfluss von Blut aus dem rechten Ventrikel in den rechten Vorhof und in einigen Fällen in die Vv. cavae einhergeht.

Bei der TI wird die strukturelle von einer funktionellen Form unterschieden. Die strukturelle TI basiert dabei auf einem Defekt der Klappe, die funktionelle TI dagegen auf einer Anulusdilatation.

1.2.1.1 Strukturelle TI

Die Ursachen für eine strukturelle TI können angeboren und erworben sein. Bei den seltenen angeborenen Ursachen dominiert die Ebstein-Anomalie, eine Fehlbildung, die mit einer Verlagerung der Klappen Ebenen in Richtung Herzspitze einhergeht und fakultativ einen Vorhofseptumdefekt (ASD) aufweist. Sie führt aufgrund der pathologischen Klappenanatomie zur TI (Chauvaud 2000).

Zu den Ursachen der erworbenen strukturellen TI zählen unter anderem der Prolaps der Klappe bei Sehnenfadenabriss sowie Veränderungen der Klappe nach rheumatischen Erkrankungen, vor allem dem rheumatischen Fieber. Ebenfalls kann es im Rahmen infektiöser oder aseptischer Endokarditis sowie durch Tumoren des Herzens oder durch ein Carcinoid (mit maligner Serotoninüberproduktion) zur Klappenrestriktion und -insuffizienz kommen (Waller, Moriarty et al. 1986). Von besonderer epidemiologischer Bedeutung ist die rheumatische Endokarditis. Diese hat in den Industrienationen weitgehend an Bedeutung verloren, zählt jedoch in Entwicklungs-

und Schwellenländern zu den häufigsten Ursachen einer TI (Bernal, Morales et al. 2005; Daniel 2006).

Weitere erworbene Ursachen sind traumatische und iatrogene Schädigungen des Klappenapparates, zum Beispiel durch endokardiale Schrittmacher- oder Defibrillatorelektroden sowie als Folge von (wiederholten) RV-Biopsien z.B. nach Herztransplantation.

Während eine akute strukturelle TI aufgrund einer deutlichen Reduktion des HZV zur Herzinsuffizienz bis zum kardiogenen Schock führt, zeigt die chronische strukturelle TI sehr lange einen asymptomatischen Verlauf und wird oft erst in fortgeschrittenen Stadien klinisch auffällig, da das Regurgitationsvolumen von variablen Faktoren wie rechtsventrikulärer Vor- und Nachlast oder RV-Kontraktilität abhängig ist und eine Anpassung bzw. Kompensation stattfinden kann.

1.2.1.2 Funktionelle TI

Von einer funktionellen Insuffizienz wird gesprochen, wenn die Klappe selbst strukturell intakt ist. Stattdessen kommt es durch Druck- oder Volumenbelastung über einen gewissen Zeitraum zu einer Ventrikelhypertrophie und nachfolgend zu einer Dilatation des Klappenanulus. Der Anulus ist Teil des rechten Ventrikels, so dass die funktionelle TI immer als Folge einer Ventrikeldysfunktion und -dilatation entsteht.

Die Dilatation von Ventrikel und Anulus führt dann zu einer funktionellen Schlussunfähigkeit, weil die Klappe die vergrößerte Öffnungsfläche des Anulus nicht mehr vollständig bedecken kann. Die funktionelle Genese ist bei einem Großteil (>75%) der Patienten Ursache einer schweren TI (Simon, Oelert et al. 1980; King, Schaff et al. 1984) und dieser Anteil steigt statistisch mit dem Durchschnittsalter der Patienten an.

Als Ätiologie besteht dabei immer eine erhöhte Druck- oder (seltener) Volumenbelastung des rechten Ventrikels.

Eine funktionelle TI entsteht in der Regel infolge einer Linksherzerkrankung mit sekundärer pulmonaler Hypertonie, z.B. bei Mitralklappenstenose oder Mitralklappeninsuffizienz (Pellegrini, Colombo et al. 1992). Eine ebenfalls mögliche Ursache ist eine primäre pulmonale Hypertonie in Fol-

ge pulmonaler Erkrankungen wie COPD und Vaskulitiden oder im Rahmen einer idiopathischen pulmonalen Hypertonie.

Charakteristisch für die funktionelle TI ist das es erst im Verlauf einer anderen Grunderkrankung zu zunehmender Schlussunfähigkeit kommt.

Bei einer Dilatation des Trikuspidalanulus durch Druck- oder Volumenbelastung des RV sind vor allem das anteriore und posteriore Segel betroffen, da sie in Verbindung mit der freien Wand des rechten Ventrikels stehen. Diese neigt bei erhöhter Volumen- und/oder Druckbelastung vorrangig zu Dilatation. Hinzu kommt die schon erwähnte dreidimensionale Form des Trikuspidalanulus, welche auch an der Pathophysiologie der TI beteiligt ist. So kann bei schweren Formen der funktionellen TI mit deutlicher Anulusdilatation ein Abflachen der dreidimensionalen Struktur hin zu einem planaren Ring beobachtet werden. Ursache ist hier ein Verlust der ovalen Form, ebenfalls durch Dilatation der anterolateralen Wand des RV (Fukuda, Saracino et al. 2006).

1.2.2 Epidemiologie der TI

Die isolierte leichtgradige TI ist eine häufige Diagnose unter Klappenvitien, die bei 80-90% aller Menschen nachgewiesen werden kann, wobei sich daraus jedoch in der Regel kein Therapiebedarf ergibt.

Dagegen liegt die Prävalenz für eine mittelschwere oder schwere TI in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht zwischen 0,3% und 5,7% und steigt mit zunehmendem Alter an (Singh, Evans et al. 1999).

Eine mittelschwere oder schwere TI ist dabei mit einer deutlich erhöhten Gesamtmortalität verbunden und zwar unabhängig von einer zusätzlich eingeschränkten LVEF oder einem erhöhten RVSP (Nath, Foster et al. 2004).

1.2.3 Diagnostik der TI

Bei der klinischen Präsentation von Patienten mit funktioneller Trikuspidalinsuffizienz sind die Symptome der zu Grunde liegenden Pulmonal- oder Linksherzerkrankung führend.

Zusätzlich führt das Regurgitationsvolumen der Klappe zur Erhöhung des Druckes im RA und den zentralen Venen mit dem klinischen Bild einer

Rechtsherzinsuffizienz sowie gleichzeitig einer Reduktion des vorwärtsgerichteten Schlagvolumens und damit zu einem Absinken des HZV.

Letzteres zieht eine Leistungsinsuffizienz mit Dyspnoe nach sich, die rechtskardiale Stauung dagegen geht mit Funktionsstörungen der Leber und des Gastrointestinaltraktes, wie einer Cirrhose cardiaque, einher (Luisada, Singhal et al. 1984). Dazu kommen Rechtsherzdekompensationen mit Aszites und peripheren Ödemen.

Die dauerhafte Druck- und Volumenbelastung durch das Regurgitationsvolumen der Trikuspidalklappe führt zu einer Vergrößerung des (rechten) Vorhofs und erhöht damit das Risiko für Vorhofflimmern oder -flattern (Rogers and Bolling 2009; Khoo, Krishnamoorthy et al. 2010).

Die Diagnostik ist hinsichtlich der körperlichen Untersuchung eingeschränkt, zudem kann das Fehlen klinischer Befunde eine fortgeschrittene TI nicht ausschließen.

So kann in fortgeschrittenen Stadien der TI ein Venenpuls der meist gestauten V. jugularis externa beobachtet werden. Die Leber ist der Ausprägung der Stauungsprozesse und der Zirrhose entsprechend in den frühen Krankheitsphasen zunächst vergrößert und weich, eventuell druckdolent, später hart, höckerig und verkleinert. Ein hepatojugulärer Reflux kann vorhanden sein.

Bei der Auskultation des Herzens kann z.T. ein hochfrequentes systolisches Herzgeräusch im vierten und fünften Interkostalraum rechts parasternal auftreten, welches durch Inspiration des Patienten stärker wird, das sog. Rivero-Carvalho Zeichen (Erdmann 1975-2009).

In den paraklinischen Befunden findet sich in der Thoraxübersicht-Röntgenaufnahme z.T. eine Rechtsherzhypertrophie.

Im EKG kann es zu Zeichen der Rechtsherzbelastung mit einer Veränderung des Lagetyps bzw. der elektrischen Herzachse nach rechts und prominenten p-Wellen (P-pulmonale) kommen. Als Zeichen der Rechtsherzhypertrophie und der damit verbundenen Konduktionsstörung ist das Vorliegen eines (inkompletten) Rechtschenkelblocks möglich.

Der Goldstandard zur Diagnostik einer TI in der klinischen Praxis ist die TTE. Die TEE, welche ein noch besseres räumliches Auflösungsvermögen

besitzt, ist für Trikuspidal- und Pulmonalklappenerkrankungen aufgrund der größeren Entfernung der Klappen vom Schallkopf nicht ideal (Hust 2000). Qualitativ wird die TI durch die Ausdehnung des Regurgitationsjets im Farbduplex eingeteilt. Orientierend liegt eine schwere TI vor, wenn der Jet das Dach des rechten Vorhofs erreicht. Moderne Verfahren ermöglichen auch eine quantitative Bewertung der TI durch Berechnung der effektiven Regurgitationsöffnung (EROA), sie beträgt bei hochgradiger TI mehr als 4cm^2 . Ebenso lässt sich das Regurgitationsvolumen bestimmen, hierbei ist von einer hochgradigen TI bei $\geq 45\text{ml}$ (Vahanian, Alfieri et al. 2012) auszugehen.

Die TTE bietet dabei die Möglichkeit zwischen einer strukturellen und einer funktionellen TI zu unterscheiden:

Zum einen anhand der Klappenöffnungsfläche in Diastole, welche ein indirektes Maß für den Trikuspidalanulusdiameter ist, zum anderen indem die strukturellen Ursachen einer TI wie Endokarditis-Vegetationen, rheumatische Segelveränderungen, traumatische Segelschäden usw. identifiziert werden können. Über die vereinfachte Bernoulli-Formel kann der systolische Pulmonalarteriendruck abgeschätzt werden.

Die Ventrikelfunktion kann anhand der Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE) sowie des Annulus Time-Velocity Integral (TVI) quantifiziert werden (Vahanian, Alfieri et al. 2012).

Das Ausmaß der rechtsventrikulären Dysfunktion kann dann helfen zwischen struktureller oder funktioneller TI zu unterscheiden.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit der invasiven Druckmessung mittels Rechtsherzkatheter.

Bei Vorliegen einer TI kann in der oberen und unteren Hohlvene sowie im rechten Vorhof eine sog. V-Welle oder Ventrikelwelle festgestellt werden (Abbildung 1).

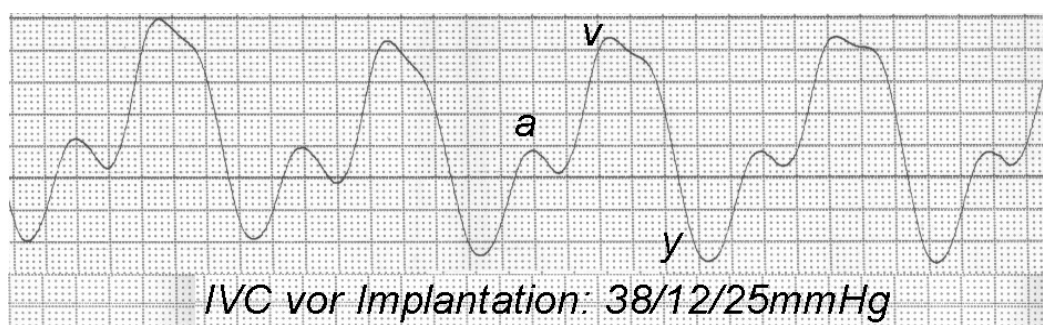


Abbildung 1: Druckaufzeichnung in der IVC nach Erzeugen einer TI, (a= A-Welle, welche durch die Vorhofkontraktion ausgelöst wird und physiologisch ist, v= deutlich pathologische V-Welle, y= negative Y-Welle durch Ventrikeldiastole).

Sie ist definiert als ein positiver Ausschlag einer Druckkurve im rechten Vorhof, nach der T-Welle im EKG. Sie kann bis zu einem Normwert von 6mmHG auch beim Gesunden vorkommen (Sypyridopoulos 2006). Die Einteilung des Schweregrades einer TI anhand einer Ventrikulographie (Dextrokardiographie, meist in 15°RAO) ist aufgrund der Lage des Katheters in der Klappe und dem häufigen Auslösen von Katheter-assoziierten Extrasystolen jedoch nicht immer sicher möglich.

Schließlich erlaubt auch die Magnetresonanztomographie eine qualitative Evaluation einer TI. Die Möglichkeiten zur Beurteilung RV-Funktion sind hier sogar der TTE überlegen, aber die eingeschränkte Verfügbarkeit und der hohe Aufwand limitieren die klinische Anwendung.

1.3 Etablierte Therapiekonzepte und experimentelle Therapieverfahren der TI

1.3.1 Konservative Behandlung

Die Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) sehen für die TI die Verwendung von Diuretika und ACE-Hemmern im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie vor (Vahanian, Alfieri et al. 2012). Bei Dyspnoe aufgrund einer Herzinsuffizienz oder bei gleichzeitig hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion werden zudem Aldosteron-Antagonisten empfohlen. Die medikamentöse Behandlung zielt auf eine Senkung der Vor- und Nachlast des rechten Ventrikels ab. Zum anderen soll durch ACE-Hemmer und Aldosteron-Antagonisten Myokardremodeling

entgegengewirkt werden. Aldosteron-Antagonisten erweisen sich bei bereits bestehender kardiogener Zirrhose als günstig, da sie den Auswirkungen des dabei bestehenden sekundären Hyperaldosteronismus entgegenwirken. Beim Vorliegen einer funktionellen TI steht die Therapie der Grunderkrankung an erster Stelle.

1.3.2 Chirurgische Behandlung – Indikation und Methoden

Die ESC-Leitlinien sind bezüglich der Indikationsstellung zur chirurgischen Therapie bei TI in der Vergangenheit eher zurückhaltend gewesen. Es wurde davon ausgegangen, dass die TI bei funktionellen Formen eine untergeordnete Rolle gegenüber der ursächlichen Linksherzerkrankung hat. Korrigiert wurde bei funktioneller TI überwiegend nur die linksventrikuläre Grunderkrankung, z. B. das Mitralklappenvitium.

Isolierte Trikuspidalklappen-Operationen sind für einzelne schwere Fälle mit struktureller, symptomatischer TI vorbehalten (Shiran and Sagie 2009; Vahanian and lung 2012). In den überwiegenden Fällen stellt sich die Frage, ob bei operativer Versorgung einer linksventrikuläre Herzklappenerkrankung, z.B. Mitralinsuffizienz, eine gleichzeitig bestehende TI mit behandelt werden sollte.

Dreyfus et al. konnten jedoch in retrospektiven Untersuchung zeigen, dass hoher pulmonalarterieller Druck, rechtsventrikuläre Hypertrophie, schlechte RV-Funktion und dilatierter Trikuspidalanulus wichtige Risikofaktoren für das Persistieren bzw. für verspätetes Auftreten einer schweren TI sind. Im Verlauf führen sie zu einem schlechteren klinischen Outcome des Patienten (Dreyfus, Corbi et al. 2005; Vahanian and lung 2012).

Die aktuellen ESC Leitlinien empfehlen daher die Therapie der TI auch bei funktionellen Formen früh genug, um eine irreversible rechtsventrikuläre Dysfunktion oder sekundäre Organschäden, wie die kardiale Zirrhose, zu vermeiden (Vahanian, Alfieri et al. 2012).

Für die operative Korrektur einer TI bei linkskardialen Eingriffen besteht eine Klasse I Empfehlung, wenn es sich um eine hochgradige TI handelt bzw. um eine mittelgradige TI mit messbarer Dilatation des Trikuspidalanulus über 40mm oder eine mittelgradige TI mit einem systolischen PAP über 60mmHG (Vahanian, Alfieri et al. 2012).

Eine Korrektur der leicht- bis mittelgradigen TI ohne die genannten Parameter wird dagegen nicht empfohlen. Prinzipiell wird die Möglichkeit einer Reparatur mittels Anuloplastie von einem Klappenersatz unterschieden. Die Anuloplastie wird dabei favorisiert, da sie das oft ursächliche Problem – die Anulusdilatation – behandelt.

Die einfachste Möglichkeit besteht dann in einer Raffung des Trikuspidalanulus nach De Vega. Dabei wird eine doppelsträngige Naht von der antroseptalen Kommissur zur posteroseptalen Kommissur geführt und der Teil des Anulus, der zwischen beiden liegt, gerafft.

Der modernere Weg besteht in einer Ring-Anuloplastie. Sie wurde erstmals in den 80er Jahren angewendet (Carpentier 1983). Dabei wird ein starrer oder flexibler Ring eingesetzt, welcher die Funktion des pathologisch vergrößerten Trikuspidalanulus übernimmt. Unterschieden werden plane Ringe von solchen, die dreidimensional geformt sind und eher der natürlichen Form des Trikuspidalanulus entsprechen. Die Ringe sind in verschiedenen Größen erhältlich, sodass eine intraoperative Entscheidung zur Größenanpassung möglich ist.

Zu den Möglichkeiten sowie Vor- und Nachteilen eines Klappenersatzes siehe Punkt 1.5.

1.3.3 Behandlungsbedarf

Ein Nachteil der chirurgischen Behandlung ist das (peri-)operative Risiko. Eine chirurgische Korrektur eines Klappenvitiums der venösen Herzseite ist eine aufwendige Operation, die unter Einsatz der Herz-Lungenmaschine erfolgt. Die operativen und perioperativen Risiken wie Vollheparinisierung, extrakorporale Zirkulation, Notwendigkeit von Bluttransfusionen, lange OP-Dauer, Nachbeatmung auf der Intensivstation und verzögerte Mobilisation sind von entscheidender Bedeutung für die bereits multimorbiden Patienten mit einer schweren TI und bedingen komplizierte und prolongierte Verläufe mit langen Klinikaufenthalten und hohen sozioökonomischen Kosten.

Die Patienten leiden häufig unter Begleiterkrankungen wie arterieller Hypertonie, eingeschränkter links- und/oder rechtsventrikulärer Funktion,

KHK, pAVK, pulmonaler Hypertonie sowie chronischen Lungenerkrankungen. Dabei liegt die 30-Tage Mortalität bei Einzeleingriffen an der Trikuspidalklappe bei über 8%, die aufgrund der funktionellen Genese häufigeren Kombinationseingriffe werden mit einer 30-Tage Mortalität von <17% angegeben (Funkat, Beckmann et al. 2012).

Die hochgradige TI wird trotz einer relativ hohen Prävalenz bei Patienten im fortgeschrittenen oder hohen Lebensalter (siehe Punkt 1.2.2) somit vergleichsweise selten operativ behandelt.

Abbildung 2 zeigt die Häufigkeit von Trikuspidalklappeneingriffen im Vergleich zu Aorten- und Mitraleingriffen in Deutschland.

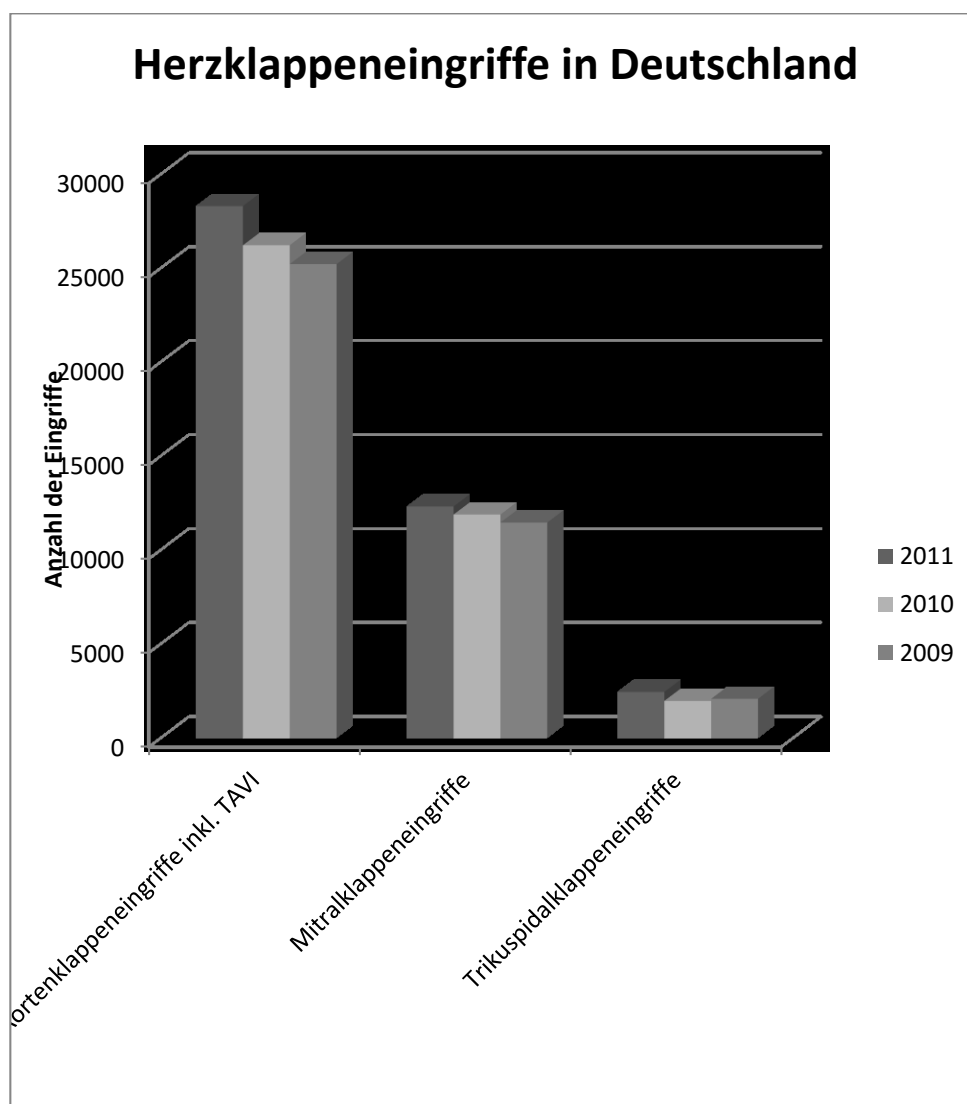


Abbildung 2: Operative Behandlung von Trikuspidalklappenerkrankungen in Deutschland im Vergleich zur operativen Behandlung an Aorten- und Mitralklappe. Aortenklappe inkl. TAVI-Prozeduren sowie jeweils inkl. Kombinationseingriffen mit ACVB (Gummert, Funkat et al. 2010; Gummert, Funkat et al. 2011; Funkat, Beckmann et al. 2012).

1.3.4 Präklinische und klinische Erfahrungen der interventionellen Behandlung

Interventionelle Behandlungsverfahren der TI sind bisher noch nicht klinisch etabliert. Es gibt verschiedene katheterbasierte Konzepte, die sich vor allem hinsichtlich der Klappenposition (orthotop vs. heterotop) und des Klappenmaterials (bovine Jugularklappen, porkine Pulmonal- oder Aortenklappen, bovines Perikard) unterscheiden. Eine tierexperimentelle Studie dazu zeigte in der Vergangenheit die prinzipielle Machbarkeit einer solchen Intervention im Tiermodell sowie die Herausforderungen eines orthotopen Ersatzes (Boudjemline, Agnoletti et al. 2005).

Denn die Fixierung der Klappenprothese im Trikuspidalanulus erwies sich als schwierig. Die Autoren implantierten Klappen orthotop mit Hilfe eines sanduhrförmigen Metallgeflechts, welches sich im Vorhof und Ventrikel abstützt. Im Mittelteil liegt der Stent, der die Klappe trägt.

Die Klappen wurden in gesunde Schafe ohne TI implantiert. Obwohl technisch machbar, erwies sich die Größenanpassung des Implantats an den Anulus sowie die Entfaltung und Fixierung im sich dynamisch ändernden Trikuspidalanulus als praktisch sehr anspruchsvoll.

Die heterotope Klappenimplantation hat bereits erfolgversprechende Ergebnisse im Tierversuch mit akuter TI gezeigt (Lauten, Figulla et al. 2010) und auch die erste Anwendung beim Menschen ist bereits erfolgt (Lauten, Ferrari et al. 2011). Das Konzept stellt aufgrund der einfacheren Platzierungs- und Verankerungsmöglichkeiten eine Prozedur mit niedrigem periinterventionellen Risiko dar. Gleichzeitig sollen die beiden pathophysiologisch für den Patienten schwerwiegendsten Symptome behandelt werden: Eine Verringerung des Rückwärtsversagens und der kardialen Zirrhose und Ödemneigung sowie die Steigerung des HZV mit Verbesserung der eingeschränkten kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit der Patienten. Aufgrund der niedrigen Druck- und Strömungsverhältnisse im venösen Kreislauf sind die Anforderungen an das Klappenmaterial jedoch anders als bei den bereits etablierten Anwendungen z.B. in Aortenklappenposition.

1.4 Herzklappenprothesen – Eigenschaften und Unterschiede

Für den Herzklappenersatz wird zwischen mechanischem und biologischem Ersatz unterschieden. Mechanische Klappen bestehen aus Metall oder Karbon. Sie werden, vor allem aufgrund ihrer sehr guten Haltbarkeit, im arteriellen System häufiger verwendet als im venösen.

Am häufigsten verwendet wird die Zweiflügelklappe, die aufgrund guter Hämodynamik und hoher mechanischer Zuverlässigkeit zum Standard für mechanischen Klappenersatz geworden ist. Die hohe Lebensdauer übertrifft meist die Lebenserwartung des Patienten. Fehlfunktionen sind äußerst selten.

Nachteilig ist jedoch die lebenslange Notwendigkeit einer oralen Antikoagulation, welche ein erhöhtes Risiko für Blutungskomplikationen mit sich bringt.

Weiterhin ist die Möglichkeit der perkutanen Implantation bei mechanischen Klappen nicht gegeben.

Beim biologischen Herzklappenersatz lässt sich zwischen Xenografts (tierisches Material) und Allografts (von Organspendern gewonnene, humane Herzklappen) unterscheiden. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit werden Allografts nur im Ausnahmefall zur Behandlung erworbener Herzfehler verwendet. So wurden in Deutschland in den Jahren 2010 – 2013 weniger als 50 Aorten- und Mitralklappen pro Jahr durch Allografts ersetzt (Gummert, Funkat et al. 2011; Funkat, Beckmann et al. 2012; Beckmann, Funkat et al. 2014; Funkat, Beckmann et al. 2014).

Die Xenografts werden aus porcinen Herzklappen (native Klappen) oder bovinem bzw. porcinem Perikard hergestellt. Der Hauptvorteil aller biologischen Prothesen liegt in ihrer geringen Thrombogenität, die eine langfristige Antikoagulation verzichtbar macht, sowie einem physiologischen Strömungsprofil. Der wesentliche Nachteil biologischer Herzklappenprothesen besteht in der begrenzten Haltbarkeit durch Degeneration, welche im Langzeitverlauf zum Funktionsverlust führen kann.

Zur Aufbereitung wird in den meisten Fällen eine GA-Fixierung des Materials mit dem Ziel der Kreuzvernetzung der Oberflächenantigene vorgenommen. Dabei findet eine Quervernetzung von Aminogruppen-Epitopen

durch kovalente Bindung der reaktiven Aldehydgruppen des bifunktionalen Glutaraldehyd statt. Ziel ist die Steigerung der biologischen Halbwertszeit durch eine Erhöhung der mechanischen und thermischen Stabilität und eine Minderung der Antigenität (Southern, Hughes et al. 2000) .

Diese seit 1969 praktizierte Fixierung von biologischen Klappen sowohl bei nativen wie auch Perikardklappen erzeugt jedoch ein avitales Gewebe. Der Vorgang selbst kann dabei aufgrund der Bindungsfähigkeit der entstandenen Moleküle und des verbliebenen Glutaraldehyds für freies Calcium zu Verkalkung und Degeneration beitragen (Carpentier, Lemaigre et al. 1969; Liao, Frater et al. 1995). Weiterhin ist die entstehende Oberfläche trotz der Behandlung immunogen und lässt eine Host-versus-Graft-Reaktion zu (Dahm, Lyman et al. 1990).

1.4.1 Anforderungen an eine „ideale Herzklappenprothese“

Die „ideale“ Herzklappenprothese muss über die Fähigkeit zum raschen und vollständigen Klappenschluss auch unter den niedrigen Druckbedingungen des venösen Kreislaufes verfügen. Ihre Öffnungsfläche sollte dabei einer nativen Klappe entsprechen. Sie sollte eine mechanische Stabilität aufweisen, die auch unter den hohen Druckbedingungen des arteriellen Systems einen zuverlässigen Klappenschluss gewährleistet.

Das Material müsste über eine niedrige Thrombogenität verfügen, weil sich ein funktionsfähiges Endothel nach der Implantation rasch ansiedelt.

Sie sollte nicht immunogen sein, um Entzündungsprozesse und Kalzifikation zu vermindern, somit auch resistent gegen Degeneration sein.

Das Infektions- bzw. Endokarditisrisiko müsste nach der Implantation möglichst gering sein.

Im Idealfall besteht sie aus einer Matrix, die von körpereigenen Zellen besiedelt werden kann und von diesen in einem sog. „Turnover“ (Abbau und Neubildung im Gleichgewicht) aufrechterhalten wird. Damit wäre die Möglichkeit zur Defektreparatur und im Idealfall zum Wachstum im Empfängerorganismus gegeben.

1.4.2 Tissue Engineering zur Herstellung von Herzklappenprothesen

Um dieses Ziel zu erreichen gibt es verschiedene Ansätze: Alle verfügen über eine zellfreie Matrix, die von körpereigenen Zellen, z.B. Endothelzellen und (Myo-) Fibroblasten oder deren Vorläufern besiedelt wird (Asahara, Murohara et al. 1997; Cebotari, Lichtenberg et al. 2006; Schmidt, Mol et al. 2007). Die Ansätze unterscheiden sich nach der Art der Matrix: Kunststoffpolymere, biologische Gele und dezellularisiertes xenogenes oder allogenes Gewebe (Perikard oder native Klappen). Eine weitere Unterscheidung besteht darin, ob eine Besiedlung dieser Matrix durch Zellen in vitro in einem Bioreaktor unter statischen und dynamischen Bedingungen sowie dem Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Karim, Golz et al. 2006; Lichtenberg, Tudorache et al. 2006) vor der Implantation vorgenommen oder diese danach in vivo erwartet wird.

Biologische Gele bestehen vorwiegend aus Kollagen in welches Bindegewebszellen eingekapselt werden können. Kunststoffpolymere bestehen aus aneinandergereihten Monomeren, ähnlich wie Cellulose oder Viskose. Biologische Gele als Matrizen besitzen initial nicht die ausreichende mechanische Stabilität einer kompetenten Klappe und können so nicht direkt in vivo eingesetzt werden. Sie müssen oft zeitaufwendig und teuer in vitro besiedelt werden, wobei auch dabei Veränderungen an der Geometrie entstehen, welche die Kompetenz der Klappe beeinträchtigen können (Shinoka, Ma et al. 1996). Allogenes Material ist aufgrund der sehr limitierten Verfügbarkeit nur eingeschränkt verwendbar. Der aufgrund seiner Eigenschaften geeignetste Ansatz basiert daher auf dezellularisiertem xenogenem Material. Sie bestehen nur aus der extrazellulären Matrix (ECM) nativer Klappen bzw. Perikards und bieten eine Plattform für die Anhaftung von körpereigenen Zellen, welche dann einen ECM-Turnover ermöglichen und somit ebenfalls im Laufe der Zeit die ursprüngliche ECM ersetzen können.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion und Haltbarkeit von dezellulierten Klappen in einem Modell der hochgradigen TI zu evaluieren und mit konventionell GA-fixiertem Material zu vergleichen. Dabei liegen zwei Schwerpunkte zugrunde:

1. Untersuchung der hämodynamischen Effekte und der Haltbarkeit beider Prothesentypen im chronischen Tiermodell.
2. Makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Klapfenmaterialien im Vergleich und Bewertung der Degeneration und Rezellularisierung.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Herzklappenprothesen

Die Herstellung der Klappenprothesen erfolgte aus Rinderperikard, welches in einen Nitinol-Stent eingenäht wurde. Nitinol ist eine Nickel-Titanlegierung, die zu den sog. Formgedächtnis-Legierungen gehört. Der Vorteil des Materials liegt in den thermoelastischen Eigenschaften, welche eine Selbstexpansion in vivo ermöglichen. Stents aus Nitinol werden in der interventionellen Kardiologie bereits seit über 20 Jahren intrakoronar und intraaortal eingesetzt (Topol 1994; Nienaber, Fattori et al. 1999). Im Rahmen der Studie wurden Stents in 50mm Länge und 28mm Durchmesser (IVC) sowie 50mm Länge und 26mm Durchmesser (SVC) verwendet (Medicut, Pforzheim, Deutschland).

Aus zwei Gründen wurde in dieser Studie bovines Perikard an Stelle von nativen Aortenklappen verwendet: Zum einen wird durch die flexible Größenauswahl eine genauere Anpassung ermöglicht, zum anderen bietet Perikard den Vorteil einer höheren mechanischen Belastbarkeit im Hinblick auf die Faltung in den Implantationskatheter im Vergleich zu nativen Klappen.

Bei acht Klappen wurde konventionell GA-fixiertes bovines Perikard verwendet (Neovasc, Richmond, Canada). Die fertigen Klappen wurden bis zu ihrer Verwendung in 0,25% Glutaraldehyd-Lösung gelagert.

Acht weitere Klappen wurden aus bovinem Perikard hergestellt, welches nach einem etablierten Protokoll dezellularisiert wurde (Akhyari, Aubin et al. 2011). Dies beinhaltete eine abwechselnde Behandlung mit 80% Glycerin/25mM EDTA, 4,2% Natriumdesoxycholat, 1% SDS und 3% Triton-X100, jeweils gepuffert mit 0,05% NaN₃ über 72h. Die Lösungen wurden dabei alle 12h gewechselt, gefolgt von einem 72-stündigen Auswaschen von Tensid-Residuen, wobei auch hier die Lösung alle 12h gewechselt wurde. Die Lagerung der fertigen Klappen erfolgte bei 4°C in steriler 0,9% Natriumchlorid-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland).

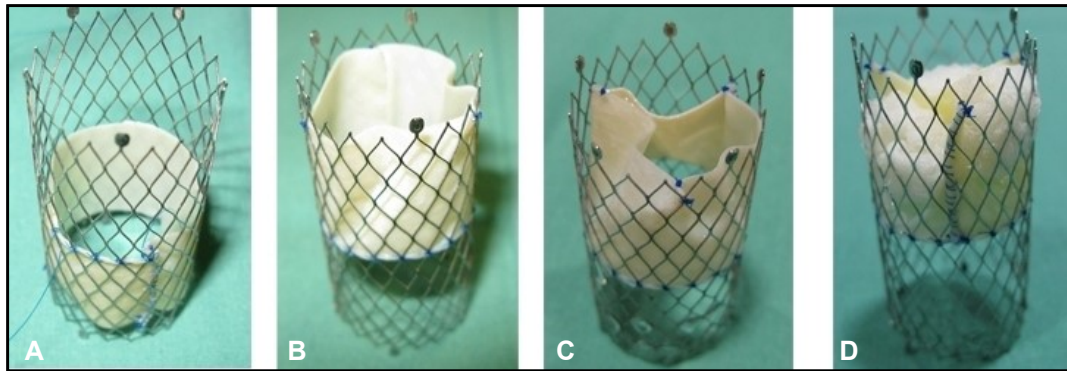


Abbildung 3: Schritte zum Aufbau der Klappe aus einem rechteckigen Perikardstreifen. (A): Fixierung des Unterrandes; (B,C): Ausbildung der Taschen; (D): Formen der Taschen mit Gaze.

2.1.1 Beschreibung der Nahttechnik

Die Herstellung der Klappe beginnt mit einem rechteckigen Perikardstreifen, dessen Maße für einen 50mm x 28mm Stent ca. 88mm x 20mm betragen (Abbildung 3). Dieser Streifen wird mit synthetischem, monofilen, nicht-resorbierbaren Nahtmaterial (Ethicon, Prolene 5.0, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) an den kurzen Seiten zu einem Zylinder vernäht. Dieser Zylinder wird nun in das Innere des Stents gelegt und dort auf einer Höhe fixiert, sodass der obere Rand des Perikardzylinders knapp unter dem oberen Rand des Stents zum Liegen kommt (Abb. 3 A). Mit einer fortlaufenden Naht wird nun der untere Rand gesichert, welcher etwa in der Mitte des Stents zum Liegen kommt (Abb. 3 A, B). Danach werden vom oberen, freien Rand des Perikardzylinders drei Ecken an den Stent-Stegen fixiert, was die spätere Funktionsform mit drei Taschen ermöglicht (Abb. 3 C). Nach wenigen weiteren Einzelknopfnähten zur Sicherung wird Mull-Gaze in den nun entstandenen Raum zwischen Stent und Zylinder eingeführt, um die Ausbildung der Taschen zu forcieren (Abb. 3 D). In dieser Form wird der Stent für 24h im Falle der konventionellen Perikardklappen in Fixationslösung (0,25% Glutaraldehyd) bei 4°C gelagert. Die Klappen aus dezellularisiertem Perikard wurden analog bei gleicher Temperatur in sterilem NaCl 0,9% (Braun, Melsungen Deutschland) gelagert, um die Ausbildung der Taschen und damit eine physiologische Form zu fördern. Zeigte sich bei der anschließenden Überprüfung eine vollständige zirkuläre Koaptation der Taschen, erfolgte zur Abdichtung eine Umnähung des Stents mit einer Perikardmanschette. Die Maße überragen dabei die

des früheren inneren Zylinders leicht, sodass hier ein Perikardstreifen, wiederum für einen 50mm x 28mm Stent, von ca. 90mm x 25mm verwendet wurde (Abbildung 4).

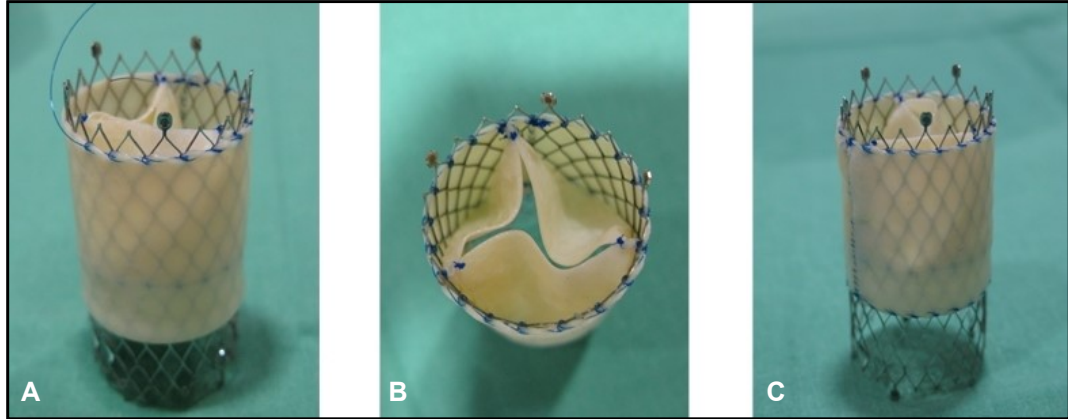


Abbildung 4: Perikardmanschette und fertige Herzklappenprothese (26mm Durchmesser)
(A): Fixierung der Perikardmanschette; (B, C): fertige Prothese.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Studiendesign

Es wurden 8 Schafe zwei Gruppen von je 4 Tieren zugeordnet.

Nach dem Erzeugen einer hochgradigen TI wurden zwei Herzklappenprothesen je Tier implantiert. Bei Gruppe 1 wurden Klappen aus GA-fixiertem Perikard verwendet, bei Gruppe 2 aus dezellularisiertem Perikard.

Die verwendeten Stents und Nahtmaterialien waren in beiden Gruppen analog. Verwendet wurden je eine 26mm Klappe für die Vena cava superior und eine 28mm Klappe für die Vena cava inferior.

Es war ein Tiermodell mit einer hochgradigen TI notwendig, da die heterotop Implantation ohne TI nicht sinnvoll ist. Ohne TI-bedingten Rückfluss erfolgt kein Klappenschluss, eine Funktion kann somit nicht bestimmt werden.

Aus eigenen Vorversuchen ist die strukturelle Schädigung als ein Mechanismus zur Erzeugung einer TI bekannt. Dieser wurde im Vorfeld durch ein Banding der Pulmonalarterie ergänzt. Die resultierende Erhöhung des RVSP vergrößert das Regurgitationsvolumen der danach folgenden struk-

turellen Schädigung mit dem Ergebnis einer reproduzierbar hochgradigen TI.

Die Studie erfolgte in 3 Phasen:

1. Baselineuntersuchung am gesunden Tier und pulmonalarteriell Banding.
2. Induktion der TI und Implantation der Herzklappenprothesen nach 6 Wochen.
3. Chronische Versuchsphase sowie der Evaluation und Explantation nach weiteren 6 Monaten.

Zum Ablauf siehe auch Abbildung 5.

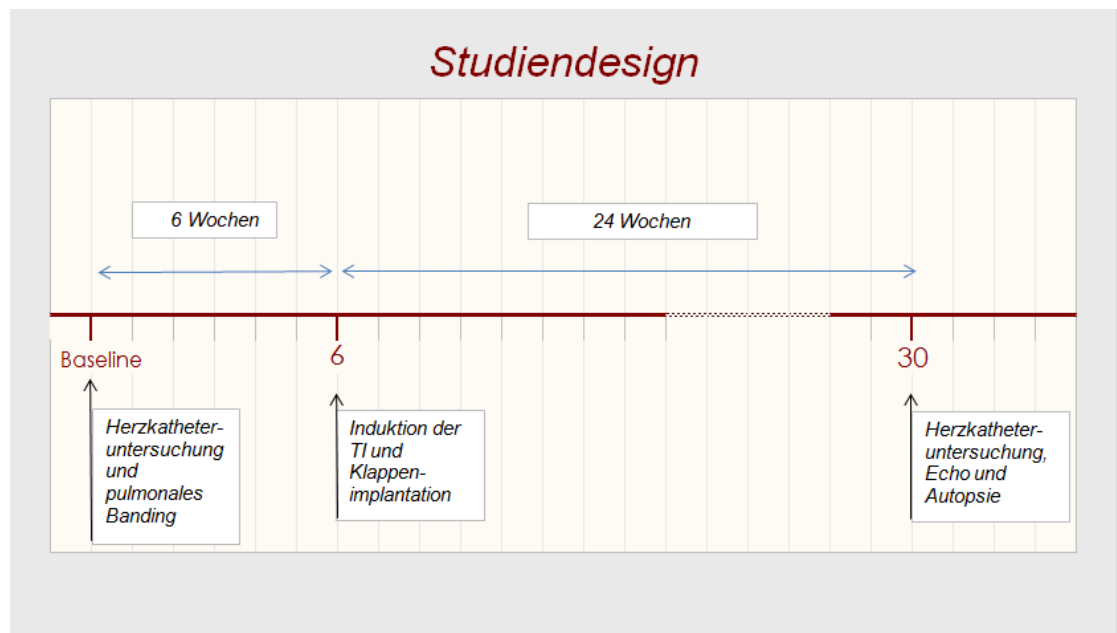


Abbildung 5: Studiendesign und zeitlicher Ablauf.

Die Betreuung, Pflege und Haltung der Tiere erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger sowie Veterinärmediziner. Haltung und Fütterung erfolgten nach den Empfehlungen der europäischen Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2007) 2525). Alle Versuche fanden nach Genehmigung durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena statt.

Es kamen ausschließlich weibliche Merinoschafe zum Einsatz. Das Gewicht der Tiere lag dabei zwischen 54kg und 98kg (Mittelwert 74 ± 6.4 kg SD). Das Merinoschaf bietet sich aufgrund seiner anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Herz-Kreislaufsystem des Menschen als Modell an und ist in der kardiovaskulären Medizin etabliert.

2.2.2 Narkose und perioperatives Management

Die Prämedikation des Schafes erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 20mg Ketamin (Ketanest, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und 3mg Midazolam (Dormicum, Roche, Basel, Schweiz). Zur Narkoseeinleitung wurde das Tier in den Einleitungsraum gebracht, entsprechend den benötigten Zugängen geschoren und enthaart sowie für das weitere Monitoring vorbereitet und orotracheal intubiert (Tubusgröße 7,5 - 8,5F Braun, Melsungen, Deutschland). Danach wurde das Tier in den Hybrid-OP (monoplanare Angiographieanlage, Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland) des Institutes transportiert und auf dem Operationstisch in Rückenlage an den Extremitäten fixiert. Nach Legen eines intravenösen Zugangs in die Vena jugularis externa links sowie eines zentralvenösen Zugangs (Certofix Trio SB 730, Braun, Melsungen, Deutschland) in die linke Vena jugularis interna erfolgte die Narkoseaufrechterhaltung mit Isofluran 1-2% Vol. und volumenkontrollierter Beatmung (Kreisteil Siemens Servo 900C, München, Deutschland). Zur intraoperativen Schmerztherapie bei Verlegung der arteriellen und venösen Schleusen bzw. Thoraxeröffnung wurden 0,3mg Fentanyl intravenös verabreicht. Blutgasanalysen (ABL 520, Radiometer, Willich, Deutschland) zu Beginn und am Ende des Eingriffs

dienten der Überwachung des metabolisch-respiratorischen Status. Während des Eingriffs erfolgte eine parenterale Flüssigkeitssubstitution (kontinuierlich HAES 6%, sowie NaCl 0,9% und Jonosteril– Braun Medical, Melsungen, Deutschland). Zur Prophylaxe von Rhythmusstörungen wurde Xylocain (1%, 1mg/kgKG/h mibe GmbH, Brehna, Deutschland) kontinuierlich über einen Perfusor verabreicht. Zur Prophylaxe von Thrombembolien wurde das Tier mit 2500 – 5000 I.U. (gewichtsadaptiert) unfractioniertem Heparin (Heparin Natrium, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) antikoaguliert.

Das Monitoring umfasste bei allen Eingriffen kontinuierliches EKG-Monitoring, die invasive Messung des arteriellen und des rechtsventrikulären Drucks, die Registrierung der peripheren pulsoxymetrischen Sauerstoffsättigung und die intermittierende arterielle Blutgasanalyse. Nach Einleitung der Narkose wurde unter sterilen Bedingungen ein femoralarterieller Zugang in Seldinger-Technik mit einer 8,5 French Schleuse (OptiMed Medizinische Instrumente GmbH, Ettlingen, Deutschland) angelegt. Über diese Schleuse wurde auch ein Picco-Katheter zur kontinuierlichen Messung des HZV eingeführt (PiCCO Plus PC 8100, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland). Eine weitere 8,5 French Schleuse in der Vena femoralis ermöglichte den Rechtsherzkatheter (Expo-Angiographie-Katheter, Boston Scientific, Natick, USA und Corodyn P2 Einschwemm-katheter, Braun, Deutschland) mit IVC-, RA-, RV- und PAP-Druckmessung.

2.2.3 Rechtsherzkatheter und pulmonalarterieller Banding

Ziel waren die Konstriktion der Pulmonalarterie bis zu einer Verdopplung des RVSP (abhängig vom Ausgangswert etwa 35-45mmHG systolisch) und der Erhalt einer weitgehend adäquaten Herz- und Kreislauffunktion.

Nach Vorbereitung, Anästhesie und Anlage des Monitorings inkl. invasiver Zugänge wurde die anterolaterale Thorakotomie durchgeführt.

Der kardiale Situs wurde unter sorgfältiger Blutstillung durch Eröffnung des Perikardbeutels über dem rechtsventrikulären Ausflusstrakt und dem Pulmonalarterienstamm durch y-förmige Schnittführung dargestellt. Es

wurde nun am frei liegenden Herzen die Pulmonalarterie unter Separation von den umgebenden Gewebsschichten frei präpariert. Zwischen der Pulmonalarterie und der von ihr überkreuzten Aorta wurde durch weitere Präparation ein genügend großer Durchgang geschaffen um das Gefäßbändchen um die Pulmonalarterie zu legen. Es wurde ein nicht elastisches Gefäßband (Ethiloon, Johnson&Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) zur zirkulären Konstriktion verwendet.

Unter kontinuierlichem Monitoring wurde eine Konstriktion der Pulmonalarterie herbeigeführt, mit dem Ziel einer Verdoppelung des RVSP. Der arterielle Mitteldruck sollte dabei stabil bleiben. Nach Erreichen der hämodynamischen Zielparameter wurde die Thoraxwand nach Einlegen einer Thoraxdrainage schichtweise verschlossen.

Das Tier wurde nach dem Ausleiten der Narkose und Wundversorgungen inklusive der Versorgung der Punktionsstellen in einen abgesperrten Bereich des Stalls gebracht, um dort bei ausreichender Reflexaktivität extubiert zu werden. Es fand eine postoperative Schmerztherapie mit Phenylbutazon oder Fentanyl statt, jeweils gewichtsadaptiert intramuskulär verabreicht. Unter Sauerstoffinsufflation sowie pulsoxymetrischer Überwachung wurde das Tier dort von geschultem Tierpflegepersonal überwacht sowie im Verlauf mobilisiert.

2.2.4 Strukturelle Schädigung und Implantation der Herzklappenprothesen

Zusätzlich zu den bereits genannten Vorbereitungen wurde den Tieren ab dem zweiten Schritt 500mg ASS (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) p. o. einmal täglich zur Thrombozytenaggregationshemmung gegeben. Zur Narkose und perioperativem Management siehe Punkt 2.2.2.

Zu Beginn wurden die Druckverhältnisse in IVC, RA und RV sowie der PA-Druck 6 Wochen nach dem ersten Eingriff dokumentiert sowie die Morphologie des rechten Vorhofs und Ventrikels mittels Durchleuchtung und Dextrokardiographie mit Kontrastmittel (Visipaque 320, GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) dargestellt.

Das HZV wurde analog dem vorangegangenen Versuch gemessen. Darauf folgte die vorsichtige und sorgfältige Eröffnung eines kleinen Haut-

areals am Hals und die Präparation der rechten Vena jugularis externa. Nach Einbringen einer 9F- Schleuse wurde das selbst entwickelte Valvulotom (0.07-Inch rostfreier Stahldraht mit Klinge) eingebracht und unter Durchleuchtung an die Trikuspidalklappe herangeführt. Diese wurde dann durch einmaliges Einführen des Valvulotoms in den Ventrikel und Zurückziehen beschädigt, um zusammen mit dem durch das Banding gesteigerten RVSP eine signifikante TI zu erreichen. Das Vorliegen einer schweren TI wurde dann per Druckmessung im Vorhof und den Hohlvenen kontrolliert und durch die vorhandene V-Welle mit einem Druckgradienten von über 10mmHG dokumentiert.

Danach wurde eine Angiographie der unteren Hohlvene zur Bestimmung des Implantationsortes durchgeführt.

Die Klappe wurden in einer Wasser/Eis-Mischung aus steriler, physiologischer 0,9% NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) gewaschen. Sie wurde in den Implantationskatheter geladen, welcher über die Vena jugularis externa rechts und über einen Führungsdraht (0.035-inch extrastiff, Terumo, Tokyo, Japan) unter Durchleuchtungskontrolle zu dem vorher angiographisch bestimmten Implantationsort in der unteren Hohlvene vorgeschoben wurde. Dort wurde die Klappe unter Durchleuchtungskontrolle freigesetzt und der Implantationskatheter wieder entfernt. Es folgte eine Kontrolle der Druckverhältnisse proximal und distal der Klappe. Eine HZV Messung wurde durchgeführt.

Darauf folgte analog die Implantation der oberen Klappe in die Vena cava superior, ebenfalls mit anschließender HZV Messung.

Danach wurden eine Kontrastmittelgabe in den Vorhof und eine Dextrokardiographie vorgenommen, um die Kompetenz beider Klappen angiographisch beurteilen zu können.

2.2.5 Evaluation und Explantation

Acht Tiere wurden über einen Zeitraum von 24 Wochen beobachtet. Die Tiere verbrachten davon 4 Wochen im Stall sowie 20 Wochen auf der Weide in Gruppenhaltung und wurden von entsprechend ausgebildeten Tierpflegern und Veterinärmedizinern betreut.

Zum Evaluationszeitpunkt wurden Narkose und perioperatives Management inkl. hämodynamischen Messungen analog der ersten beiden Schritte durchgeführt.

Danach folgte eine Angiographie inklusive einer Kontrastmittelgabe in den Vorhof und Dextrokardiographie zur fluoroskopischen Beurteilung der Klappenfunktion. Das Tier wurde in tiefer Narkose mittels venöser Injektion gesättigter Magnesium-Sulfat-Lösung eingeschläfert. Es erfolgte eine Probenentnahme der Perikardklappen, dabei wurden für verschiedene Zwecke unterschiedliche Fixierungen verwendet.

Einen Überblick über die Vorgehensweise bietet Tabelle 1:

| Probe | # | Fixierung | Zweck |
|-----------------------------|----------|--|-----------------------------|
| IVC, SVC 5x5mm | je 2 | Waschen in PBS, aufspießen auf Naturkorkscheiben 10x10mm Fixierung 24 h in 4% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (0,1M, pH 7,2) Lagerung luftfrei in Cacodylatpuffer. | SEM |
| IVC, SVC Klappe 5x5mm | je 2 | 50ml Falcon mit 40ml 4% Formaldehyd, gepuffert. 24h Fixierung, Waschen in PBS, übertragen in 70% Ethanol | Paraffin-Schnitt Histologie |
| IVC, SVC Klappe 5x5mm | 2 | Kryofixierung in LN2, Lagerung bei -40°C | Archivierung |

Tabelle 1: Anzahl und Aufbereitung der Proben je Versuchstier. SVC: Vena cava superior, IVC: Vena cava inferior, SEM: scanning electron microscopy, #: Anzahl der Proben.

Die Probenentnahmen und Fixierungen wurden bei jedem Tier in gleicher Weise durchgeführt und entsprechen den gängigen Standards für histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Geweben.

2.3 Probenauswertungen

2.3.1 Von Kossa-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung

Aus den o. g. Proben für die von Kossa-Färbung wurden 5µm Paraffinschnitte angefertigt, die nach dem Deparaffinisieren entsprechend den in der Literatur etablierten Protokollen gefärbt wurden, um die Verteilung von anorganischem Kalzium (von Kossa-Färbung) und die verschiedenen Subtypen von Bindegewebe (Movat-Pentachrom-Färbung) zu differenzieren (Movat 1955; Puchtler and Meloan 1978).

Dazu wurden aus den Perikardproben nach dem Paraffinieren 5µm Schnitte angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden dann zunächst entparaffiniert. Für die Von Kossa-Färbung wurden sie dann nach mehrfachem Waschen mit Aqua dest. für 20min unter einer 60W Lampe in 1% Silbernitratlösung inkubiert. Danach wurden sie für 5min in 5% Thiosulfat gelegt. Es folgte wiederum ein Abwaschen mit Aqua dest. anschließend wurden sie weitere 5min in Nucelar Fast Red 0,1% (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) inkubiert. Vor dem Eindecken erfolgte schließlich eine Behandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 70%, 96%, 2x 100%, 2x Xylol je 1min.

Für die Movat-Pentachrom-Färbung wurden die entparaffinierten Schnitte für 10min in Alcianblaulösung gefärbt, nach dem Abspülen der Lösung erfolgte eine Stabilisierung für 60min in alkalischem Alkohol. Danach wurden die Präparate nach einer Waschung mit Aqua dest. über 10min mit Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt. Darauf folgte nach einem letzten Waschgang in Aqua dest. die Färbung für 15min in filtrierter Brilliant-Crocein-Säurefucin-Lösung. Alle weiteren Zwischenspülungen wurden mit 0,5% Essigsäure durchgeführt. Es schloss sich eine Differenzierung in 5%

Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 20min an. Nach Spülung in Essigsäure wurde das Präparat 3x je 5min in 100% Ethanol dehydratisiert. Als letzte Färbung wurden die Präparate 60min in einer Saffron du Gatinaise-Lösung inkubiert. Auch hier erfolgte vor dem Eindecken eine Dehydratisierung mit 100% Ethanol über 1min und die Entfettung mit Xylol für 2x 1min.

Die Von Kossa-Färbung basiert auf dem indirekten Nachweis von Kalzifikation durch Komplexbildung mit anorganischem Phosphat, welches im lichtmikroskopischen Präparat schwarz erscheint; Zellkerne färben sich rot, Zytoplasma pink.

Die Movat-Pentachrom-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung von anorganischen und biologischen Strukturen. Kollagen wird gelb, kalzifiziertes Gewebe blau-grün angefärbt. Saure Glykosaminoglykane als Zeichen kompetenter, neu angesiedelter, interstitieller Stromazellen färben sich leuchtend hellblau an, Osteoblasten und ähnliche Zellen dunkelrot und elastische Fasern rot. Zellkerne werden blauschwarz und Zytoplasma rötlich angefärbt. Die Movat-Pentachrom-Färbung erlaubt den Nachweis verschiedener pathologisch Zelltypen, u.a. Osteoblasten.

Bei allen aufgeführten Chemikalien handelt es sich um standardisierte Lösungen in Analysequalität. Zur Herstellung der nicht gebrauchsfertigen Lösungen siehe Anhang B.

2.3.2 Immunhistochemie

In den immunhistochemischen Färbungen wurde untersucht, ob eine positive Reaktion auf die Antigene alpha-smooth muscle actin, von-Willebrand-Faktor oder CD3/CD68 vorliegt.

Alpha-smooth muscle actin ist im Kontext von Rezellularisierungsvorgängen der Matrix artifizierter Gewebe ein häufig genutzter Marker für das Vorhandensein von Myofibroblasten (Nagamoto, Eguchi et al. 2000).

Die Reendothelialisierung wiederum wurde mit Hilfe des vWF nachgewiesen, welcher eine spezifische Stoffwechselleistung von Endothelzellen

darstellt (Sadler 1998). Der Vorgang der Reendothelialisierung z. B. von Metallstents in Koronargefäßen ist schon bekannt (Schneider and Dichek 1997).

Für die Immunhistochemie wurden die Proben nach dem Einlegen in ein Eindeck-Medium (Skaura Finetek, Alphen an den Rijn, Niederlande) durch eine 4% Formaldehyd-Lösung für zehn Minuten fixiert, und danach für eine Stunde in einer 5% Albuminlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die immunologische Markierung erfolgte dann durch eine 60-minütige Inkubation bei 37°C mit primären Antikörpern gegen vWF (von-Willebrand-Faktor, DAKO, Hamburg, Deutschland), sowie α -SMA und CD3 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und CD68 (Abcam, Cambridge, UK). Sekundäre Antikörper, gekoppelt an Alexa-Fluor 488 (cyano-grün) und Alexa 546 (gelb) -Farbstoffe (Invitrogen, Carlsbad, CA), wurden anschließend für 45min bei 37°C appliziert, bevor sie in ein 4',6-Diamidin-2-phenylindol, (DAPI) -haltiges Eindeckmedium überführt wurden. Die Bilder wurden mittels eines DM2000 Mikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit eingebauter DFC 425C Digitalkamera (ebenfalls Leica) aufgenommen und mit Leica Application Suite 3.7 bearbeitet.

2.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde durchgeführt, um die Oberflächenstrukturen der Klappen in beiden Gruppen zu visualisieren und die Reendothelialisierung zu evaluieren. Dazu wurden sie in 4% Glutaraldehyd und 0,1mol/l Natrium-Cacodylatpuffer fixiert. Danach wurden sie zur Vorbereitung auf die SEM in einer Reihe aufsteigender Ethanol-Konzentrations-Lösungen gewaschen und dehydriert. Schließlich wurden die Proben nochmal durch flüssiges CO₂ dehydriert und mittels eines SCD005 Sputter-Coater (BAL-TEC, Lichtenstein) mit einer extrem dünnen Goldschicht überzogen. Diese leitfähige Oberfläche ist notwendig, um das Entstehen einer elektrischen Ladung an der Oberfläche der Probe durch den Elektronenstrahl bei der Rasterelektronenmikroskopie zu verhindern. Die Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung mit Hilfe eines SEM LEO-

1450 Rasterelektronenmikroskops (Carl-Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

2.3.4 Statistik

Alle gezeigten hämodynamischen Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Verglichen wurde mittels T-Test, und ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der SPSS-Version 15.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Hämodynamik

Durch das pulmonalarterielle Banding und die Valvulotomie konnte bei allen Tieren eine hochgradige TI erzeugt werden, die in einem erhöhten Mitteldruck in der IVC und einer prominenten V-Welle in der IVC und dem RA resultierte.

Die RA V-Welle wurde durch die o.g. Maßnahmen vor der Implantation in Gruppe 1 (GA-fixierten Klappen) von einem Mittelwert von $10.0 \pm 2.7 \text{ mmHg}$ auf $18.0 \pm 6.2 \text{ mmHg}$ ($p=0.1$) gesteigert.

Bei den Tieren der Gruppe 2 (dezellularisierten Klappen) wurde die RA V-Welle vor Implantation von $7.0 \pm 2.2 \text{ mmHg}$ auf $26.0 \pm 9.8 \text{ mmHg}$ ($p=0.02$) gesteigert.

Die IVC V-Welle in Gruppe 1 wurde durch Banding und Valvulotomie von $8.5 \pm 3.4 \text{ mmHg}$ (Baseline) auf $17.8 \pm 5.6 \text{ mmHg}$ ($p=0.03$) vor Implantation gesteigert. In Gruppe 2 lag als Baseline eine V-Welle von $7.7 \pm 2.3 \text{ mmHg}$ vor, die auf $25.3 \pm 9.5 \text{ mmHg}$ ($p=0.08$) gesteigert wurde. Das HZV sank nach Valvulotomie und Induktion einer schweren TI von $6.2 \pm 0.7 \text{ l/min}$ in der Gruppe 1 auf $4.0 \pm 1.1 \text{ l/min}$ ($p=0.26$) und von $6.7 \pm 0.2 \text{ l/min}$ auf $3.4 \pm 1.1 \text{ l/min}$ ($p=0.13$) in der Gruppe 2.

Tabelle 2 zeigt die Vitalparameter und die venösen Druckwerte vor Erzeugen einer TI (Baseline), nach dem Banding, nach dem Erzeugen einer TI (TI), direkt nach Implantation und nach sechs Monaten jeweils für die GA-fixierten und dezellularisierten Klappen.

| | Baseline | Banding | Nach TI | Implantation | 6 Monate |
|--------------|----------|-----------|-----------|--------------|------------|
| HF | 96±13 | 100±12 | 89±18 | 91±14 | 94±10 |
| Gr. 1 | 96±13 | 93±5 | 96±16 | 101±6 | 90±12 |
| Gr.2 | 98±13 | 105±14 | 82±19 | 83±15 | 100±0 |
| MAD | 104.0±18 | 107.0±15 | 91.0±19 | 96.0±12# | 100.0±13 |
| Gr.1 | 100.0±21 | 104.0±21 | 98.0±26 | 93.0±19 | 107.0±10 |
| Gr.2 | 107.0±16 | 110.0±8 | 83.0±9 | 96.0±5 | 86.0±6 |
| RA-V | 8.3±2.7 | 15.9±8.9 | 22.3±8.7# | 21.7±9.4# | 29.0±10.2# |
| Gr.1 | 10.0±2.7 | 14.0±2.9 | 18.0±6.2 | 19.0±6.7 | 34.7±11.1# |
| Gr.2 | 7.0±2.2 | 18.0±12.8 | 26.0±9.8# | 25.0±13.1 | 23.3±6.7 |
| RAP | 7.1±2.6 | 12.4±6.2 | 15.6±7.8 | 15.4±6.9 | 18.3±8.9# |
| Gr.1 | 9.0±2.6 | 11.8±3.7 | 12.5±3.9 | 14.0±5.8 | 25.0±6.6# |
| Gr.2 | 5.8±1.7 | 13.0±8.6 | 18.8±10.0 | 17.3±9.1 | 11.6±4.7 |
| IVC-V | 8.1±2.8 | 13.6±4.9# | 21.5±8.3# | 17.0±5.7#* | 19.8±9.5# |
| Gr. 1 | 8.5±3.4 | 14.3±4.1# | 17.8±5.6# | 16.5±5.8# | 27.0±7.0# |
| Gr. 2 | 7.7±2.3 | 13.0±6.2 | 25.3±9.5# | 17.3±6.4* | 12.7±4.8 |
| IVCP | 7.0±2.4 | 12.6±6.0# | 16.9±8.3 | 15.3±5.9# | 16.3±8.8 |
| Gr. 1 | 7.7±2.5 | 12.0±3.7 | 13.3±5.7 | 14.8±6.2 | 23.0±5.2# |
| Gr. 2 | 6.3±2.5 | 13.3±8.2 | 19.5±9.7 | 15.8±6.4 | 9.7±5.7 |
| HZV | 6.5±0.5 | 5.4±1.2# | 3.7±1.1# | 4.8±1.1# | 3.7±1.0# |
| Gr. 1 | 6.2±0.7 | 5.3±1.1 | 4.0±1.1# | 5.3±1.1 | 4.2±0.8# |
| Gr. 2 | 6.7±0.2 | 4.8±1.7 | 3.4±1.1# | 4.3±1.1 | 3.1±1.1# |

Tabelle 2: Hämodynamische Parameter während der Versuche. Mittelwert ± Standardabweichung bei allen acht Tieren. Gr. 1: GA-fixierte Klappen, Gr. 2: dezellularisierte Klappen HF: Herzfrequenz/min, MAD: mittlerer arterieller Druck, RA-V: rechtsatriale „V-Welle“, RAP: mittlerer rechtsatrialer Druck, IVC-V: Vena cava inferior „V-Welle“, IVCP: mittlerer Vena cava inferior-Druck (alle Drücke in mmHG), HZV: Herzzeitvolumen in l/min,

*: statistisch signifikant im Vergleich zum Vorwert ($p < 0.05$) #: statistisch signifikant zum Baseline-Wert ($p < 0.05$).

Tabelle 2 zeigt eine signifikante Reduktion der erzeugten V-Welle in der IVC direkt nach der Implantation der Klappen (21.5 ± 8.3 auf 17.0 ± 5.7 mmHg; $p = 0.04$), welche sich statistisch jedoch nicht signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheidet. Weiterhin kam es durch die Implantation zu einem Anstieg des HZV um durchschnittlich 1,3l/min (Gruppe 1) bzw. 0,9l/min (Gruppe 2) wieder ohne signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen. Nach sechs Monaten zeigt sich eine deutliche Zunahme der V-Welle in der unteren Hohlvene in Gruppe 1. Im Vergleich dazu zeigt Gruppe 2 keine signifikante Differenz der V-Welle oder des Mitteldrucks in der IVC im Vergleich zu den Ausgangswerten (7.7 ± 2.3 mmHG vs. 12.7 ± 4 mmHG; $p = 0.21$).

3.2 Makroskopische Ergebnisse

Alle GA-fixierten Klappen zeigten makroskopisch Zeichen der Kalzifikation und Degeneration sowie Anhaftungen thrombotischen Materials. Auf dem Bildteil 6 A zeigte sich das Perikardmaterial der eingebrachten Klappe makroskopisch starr-brüchig und kaum beweglich. Bei den dezellularisierten Klappen (6 B) wiesen dagegen fünf von acht Prothesen eine gute bis sehr gute Funktion sowohl der Klappenöffnung, als auch des Klappenschlusses auf. Die Segel waren beweglicher, öffneten sich leichter und wiesen einen besseren Klappenschluss auf als die GA-fixierten Klappen. Makroskopisch war kein Unterschied der Degeneration zwischen den SVC- und IVC-Klappen der jeweiligen Gruppe nachzuweisen.

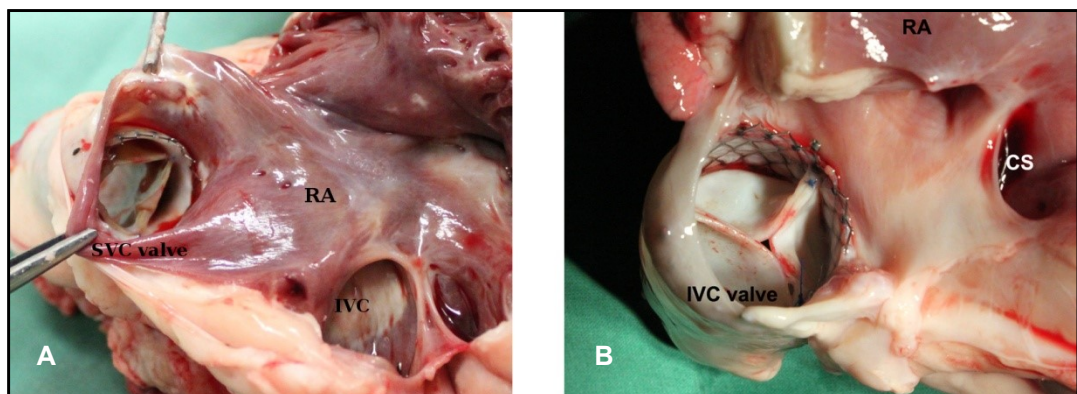


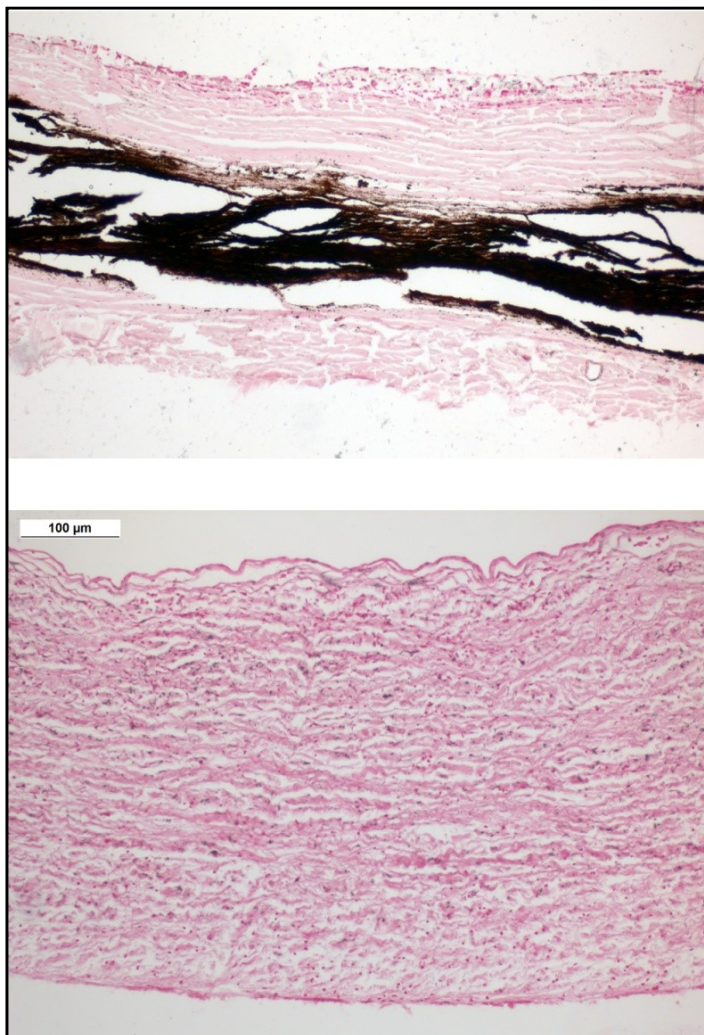
Abbildung 6: Makroskopische Bilder der Klappen nach 6 Monaten in vivo.

(A): GA-fixierte Klappe ins SVC Position (Gruppe 1); (B): dezellularisierte Klappe in IVC Position (Gruppe 2).

3.3 Histologie

3.3.1 Von Kossa-Färbung

Zu sehen ist in Abbildung 7 je ein Querschnitt durch ein Segel einer GA-fixierten und einer dezellularisierten Perikardklappe. Auffällig ist ein dreischichtiger Aufbau der GA-fixierten Klappen (7 A). Ein stark Von Kossa-positives Segment in der Mitte trennt zwei sonst unauffällige Schichten, die vorrangig aus Kollagenfasern bestehen. Es handelt sich um grobschollige Einlagerungen von Calciumphosphat als histologischer Nachweis einer Kalzifikation.



(A): Von Kossa-gefärbtes Präparat vom Segel einer GA-fixierten Perikardklappe nach sechs Monaten in vivo.

(B): Von Kossa-gefärbtes Präparat vom Segel einer dezellularisierten Perikardklappe nach sechs Monaten in vivo.

Abbildung 7: Von Kossa-Färbungen der Klappen.

Die dezellularisierten Klappen (7 B) dagegen zeigten nach sechs Monaten in vivo in der Von Kossa-Färbung keinen Hinweis auf eine höhergradige Kalzifikation. Zu sehen sind ein homogener Aufbau des Querschnittes sowie gleichmäßig verteilte Zellkerne als Hinweise auf eine einheitliche Besiedlung der dezellularisierten Matrix sowie eine zarte Schicht luminaler Zellen zu beiden Seiten (Neoendothel). Einzelne sehr kleine Kalkeinlagerungen sind zu erkennen, jedoch keine großen zusammenhängenden Kalzifikationen.

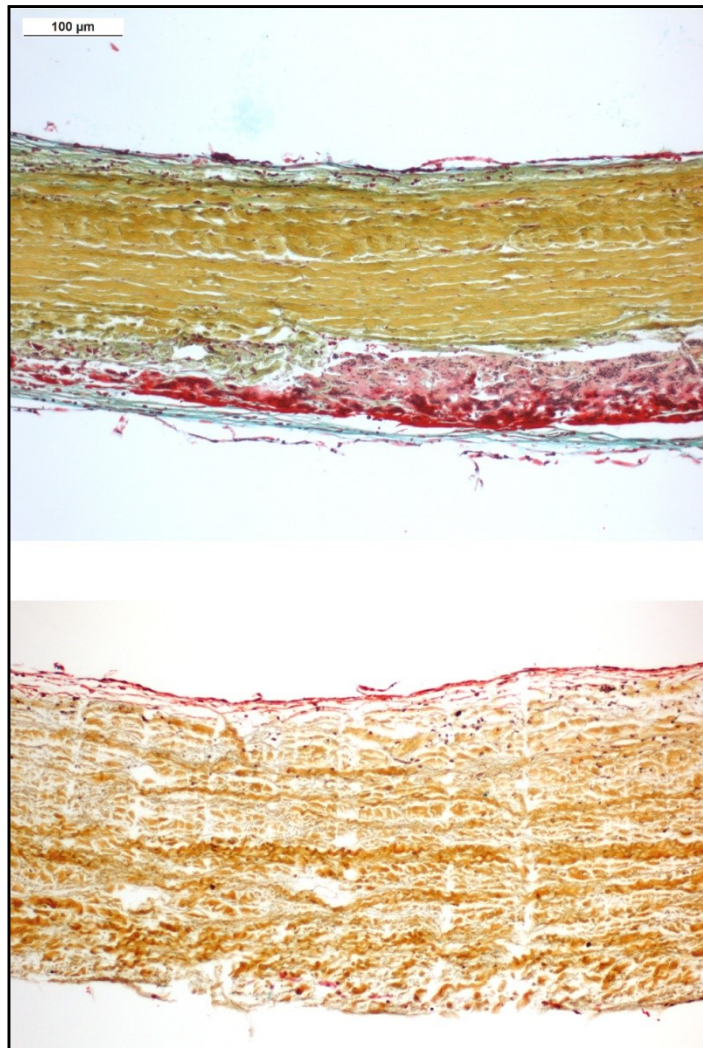
3.3.2 Movat-Pentachrom-Färbung

Die Klappen beider Gruppen zeigen in der Movat-Pentachrom-Färbung große Mengen von gelb-bräunlich gefärbtem Kollagen. Dies repräsentiert die extrazelluläre Matrix des xenogenen Perikards.

Im Präparat der GA-fixierten Klappen aus Gruppe 1 (8 A) sind zudem Schichten dunkelroter Zellen sichtbar.

Dabei handelt es sich am ehesten um Osteoblasten oder interstitielle Zellen, die eine funktionelle Umwandlung zu osteoblastischen Zellen vollzogen haben.

Die Klappen der Gruppe 1 lassen zudem erkennen, dass ein Teil des Kollagens mit grün-bläulichem, anorganisch kalzifiziertem Material durchsetzt ist. Ganz oben und unten im Bild ist als zarte, rötliche Zellschicht das Neoendothel zu sehen, darunter bläuliche die subendotheliale Matrix.



(A): Movat-Pentachrom gefärbtes Präparat vom Segel einer GA-fixierten Perikardklappe nach sechs Monaten in vivo.

(B): Movat gefärbtes Präparat vom Segel einer dezellularisierten Perikardklappe nach sechs Monaten in vivo.

Abbildung 8: Movat-Pentachrom-Färbungen der Klappen.

Auch bei den dezellularisierten Perikardklappen der Gruppe 2 dominiert das (gelb-bräunliche) Kollagen des Spendergewebes. Oben und unten kommt eine rötliche Schicht Neoendothel zur Darstellung.

Allerdings finden sich keine Hinweise auf eingelagerte dunkelrote Zellschichten (a.e. Osteoblasten) oder grün-bläuliche Ansammlungen anorganisch-kalzifizierten Materials wie bei den Klappen der Gruppe 1.

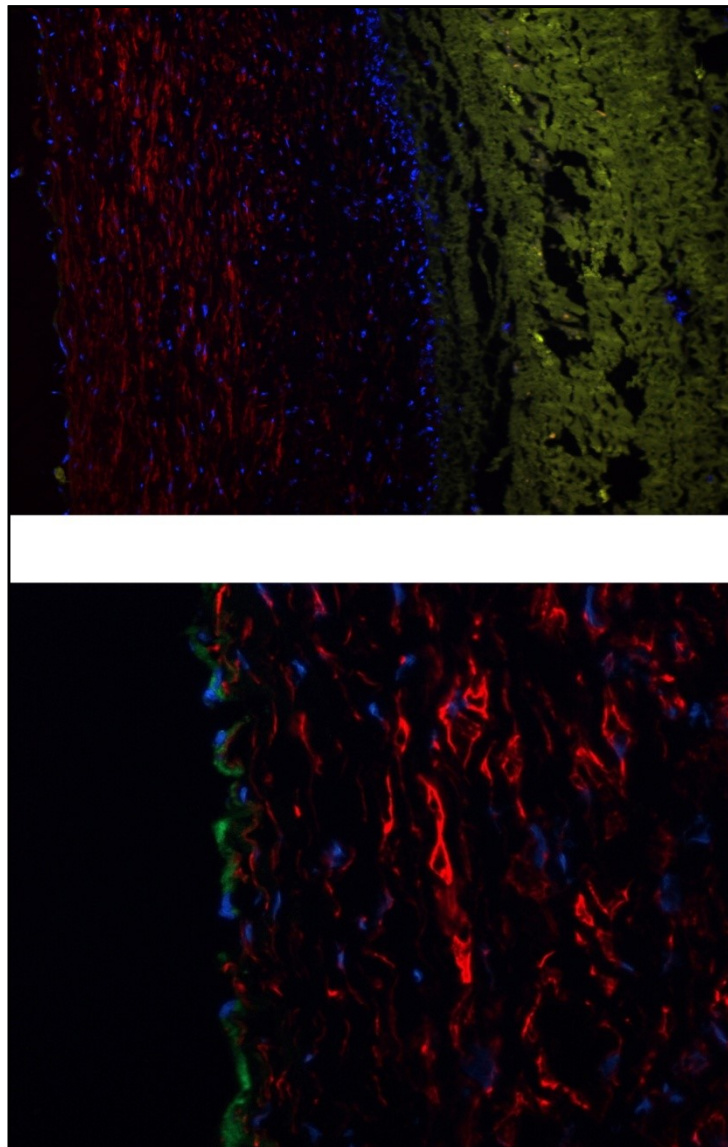
3.4 Immunhistochemie

In beiden Gruppen zeigen sich auf der luminalen Seite eine Schicht von vWF-positiven Endothelzellen, die einem Neoendothel entsprechen.

Es sind in beiden Gruppen auch α -SMA positive Zellen zu erkennen (a.e. Myofibroblasten). Sie haben, wie auf der Abbildung ersichtlich ist, die xenogene ECM-Matrix zumindest teilweise rezellularisiert.

Ein großer Unterschied besteht allerdings in der Art und Ausprägung dieser Rezellularisierung. Diese fand bei den GA-fixierten Klappen (Gruppe 1) ausschließlich oberflächlich statt, mit einem ausgeprägten Zellgradienten. Die Zelldichte nimmt bei diesem Material von der luminalen Seite des Gewebes ab. Ab etwa der Mitte des Querschnitts lassen sich keine Zellkerne mehr nachweisen (grün-gelbliches Areal), das GA-fixierte xenogene Perikard präsentiert sich als nicht rezellularisiertes „totes“ Gewebe.

Stattdessen wird ein mehrschichtiger Aufbau ähnlich dem in den Von Kossa-gefärbten Bildern des GA-fixierten Materials ersichtlich: luminal eine Schicht Endothel und subendotheliale Matrix, hier mit α -SMA-positiven Zellen, deren Dichte jedoch progredient abnimmt, dann eine gelbgrünliche Schicht, die keine Zellen enthält.



(A): Kombinierte Immunhistologie einer GA-fixierten Klappe nach sechs Monaten in vivo. Blau= Zellkerne. Links die luminale Seite mit Endothel, dann α -SMA-positive Zellen, nach rechts im Bild abnehmend, dann eine Schicht gelb-grünlicher Färbung (Eigenfluoreszenz) nahezu ohne Zellen.

(B): Kombinierte Immunhistologie einer dezellularisierten Perikardklappe. Links (luminal) eine deutliche Schicht vWF-positiver Zellen, nach rechts homogen verteilte α -SMA positive Zellen i.S. einer rezellularisierten Matrix.

Abbildung 9: Immunhistologie der Klappen.

Im dezellularisierten Perikard der Gruppe 2 (9 B) lassen sich dagegen keine zellfreien Abschnitte nachweisen, das Bild entspricht einer Rezellularisierung des gesamten Klappensegels.

Die Immunhistologie zeigt somit ebenfalls, dass bei den Klappen der Gruppe 1 ein großer Teil des Querschnitts von zellfreiem, verkalktem Material eingenommen wird. In dem dezellularisierten Perikard der Klappen der Gruppe 2 hingegen zeigt sich histologisch das Bild von gleichmäßig in die ECM eingebetteten Myofibroblasten. Die beiden verwendeten Marker für immunkompetente Zellen (CD3, CD68) waren in keinem der Materialien in relevantem Ausmaß nachweisbar.

3.5 Rasterelektronenmikroskopie

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 10) wird bei beiden Materialien zunächst eine uniforme Zellschicht von Neoendothel sichtbar, in welchem die Endothelzellen eine polygonale Form annehmen. Sie bilden ein Monolayer aus, welches aufgrund seiner Morphologie auch als „Kopfsteinpflaster“ bezeichnet wird.

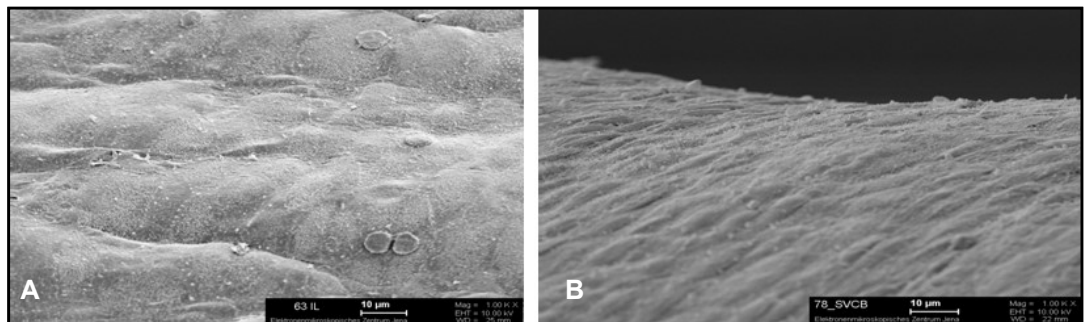


Abbildung 10: Monolayer von Endothelzellen, jeweils nach sechs Monaten in vivo.
(A): GA-fixierte Perikardklappen; (B): dezellularisierte Perikardklappen.

Hierbei ist im Überblick kein Unterschied zwischen beiden Materialien zu erkennen, der Endothelüberzug erschien optisch dicht und homogen. Bei detaillierter Inspektion der Oberflächen zeigt sich jedoch auf einer Probe des GA-fixierten Perikards thrombotische Auflagerungen mit eingebauten Erythrozyten an mehreren Stellen sowie eine Unterbrechung des Endothels mit thrombotischem Material an einer einzelnen Stelle. (Abbildung 11)

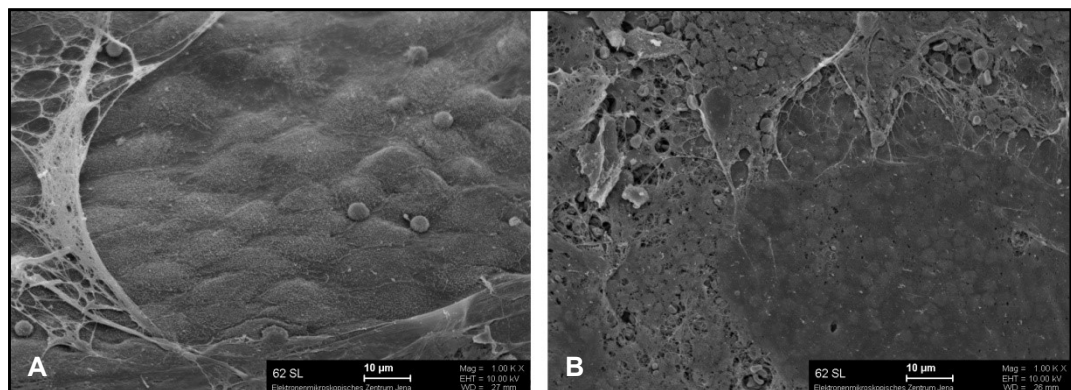


Abbildung 11: GA-fixierte Perikardklappe.
(A): Thrombotisches Material; (B): Endotheldefekt mit thrombotischem Material.

4 Diskussion

4.1 Bewertung der hämodynamischen Effekte und der Haltbarkeit beider Materialien im Langzeitversuch

Die Untersuchung der hämodynamischen Effekte und der Haltbarkeit der Klappenprothesen im Langzeitversuch ist der erste Schwerpunkt dieser Arbeit.

Eine negative Auswirkung der orthotopen Position der Klappen in den zentralen Venen oder eine Klappenprothesen-assoziierte Komplikation wie Thrombosierung, Embolie, Prothesendislokation oder -endokarditis konnte bei keinem der durchgeführten Versuche festgestellt werden.

Im Follow-Up zeigten sich bei den Tieren keine Herzinsuffizienzsymptome. Die Implantationen, die postoperative Nachsorge sowie Mobilisation der Tiere waren unkompliziert und sicher. Die Stents waren gut im Gefäß verankert und hatten nach sechs Monaten eine stabile Position ohne lokale Komplikationen. Gefäßverletzung oder -perforation kamen nicht vor. Durch die Herzklappenprothese verursachte Herzrhythmusstörungen traten während der Untersuchungen nicht auf.

Dabei zeigten die Materialien (dezellularisiertes Perikard vs. GA-fixiertes Perikard) bei der Herstellung und Lagerung der Klappen keine Unterschiede. Auch die initiale hämodynamische Wirksamkeit der Klappen nach der Implantation erwies sich ohne statistisch signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 2).

Im Bereich Hämodynamik und objektivem funktionellen Outcome nach sechs Monaten zeigte sich dagegen eine klare Überlegenheit der dezellulisierten Klappenprothesen.

Als Surrogatparameter für die hämodynamische Wirksamkeit der Klappen wurde die Höhe der V-Welle distal der implantierten Klappe angenommen. Nachdem beide Klappenmaterialien initial eine vergleichbar gute Senkung der V-Welle lieferten, analog dem in beiden Gruppen nachweisbaren Anstieg des HZV (Tabelle 2), war nach sechs Monaten ein deutlicher Unter-

schied nachweisbar. Bei den GA-fixierten Klappen kam es zu einem Wiederanstieg der V-Welle distal der IVC-Klappe in Richtung der Ausgangswerte. Im Gegensatz dazu konnten die dezellularisierten Klappen eine gleichbleibende Reduktion der V-Welle liefern. Die Gründe hierfür liegen bei den dezellularisierten Klappen vor allem in ihrer unveränderten makroskopischen Funktionalität. Diese gründet sich wiederum vor allem in den besseren mikroskopischen Ergebnissen (s.u.).

4.2 Schlussfolgerungen aus dem Vergleich der makroskopischen und mikroskopischen Ergebnisse

Die „ideale“ Herzklappenprothese (Punkt 1.5) sollte unter anderem eine niedrige Thrombogenität durch einen Überzug aus körpereigenen Endothelzellen (Neoendothel) besitzen. Dieser Punkt traf nach den genannten Ergebnissen aus Histologie und Immunhistochemie sowie SEM für beide Materialien zu. Ob es sich bei dem auf einer GA-fixierten Klappe gefundenen Mikrothromben bzw. dem Endotheldefekt um ein Artefakt handelt oder ein Zeichen für Degeneration, kann aufgrund der geringen Zahl an Proben und der aufwendigen Auswertung nicht zweifelsfrei geklärt werden. Artifizielle Endotheldefekte durch Handhabung und Transport kamen in den SEM-Bildern in beiden Gruppen vor, jedoch waren diese Endotheldefekte durch die Aufbereitung stets größer, schärfer lokalisiert und nicht mit thrombotischem Gewebe belegt.

Weitere Anforderungen waren die Beständigkeit des Materials gegenüber Degeneration und die Möglichkeit der Rezellularisierung, um eine Anpassung und Defektreparatur sowie ggf. ein Wachstum zu gestatten.

In diesem Punkt unterscheiden sich vor allem die mikroskopischen Ergebnisse der Materialien stark, was die Grundlage für die beobachteten Unterschiede in Hämodynamik und funktionellem Outcome darstellt.

Denn in den niedrigen Blutdruck- und Flussbedingungen des venösen Kreislaufes spielen besonders die zarten, leicht beweglichen Segel der dezellularisierten Klappen eine Rolle für die optimale Funktion.

Hier findet sich die Limitation der GA-fixierten Klappen. Diese zeigten schon makroskopisch deutlich verdickte, verkalkte und in der Beweglichkeit eingeschränkte Segel infolge von Degeneration. Sichtbar wurde dies in den histologischen Bildern, vor allem der schweren Kalzifikation (Von Kossa-Färbung). In der Movat-Pentachrom-Färbung fallen bei den Klappen der Gruppe 1 dunkelrote durch Inflammation und Zytokine in Osteoblasten umgewandelte interstitielle Zellen auf, ein weiteres Zeichen der Degeneration.

In den immunhistochemischen Bildern bestätigt sich dieses Bild, hier ist bei den GA-fixierten Klappen ein Endothelüberzug sichtbar, darunter liegend zeigte sich jedoch ein abnehmender Gradient α -SMA-positiver Zellen, der schließlich an einer zellfreien Schicht endete.

Diese Schicht, die in den lichtmikroskopischen Bildern mit massiven Ablagerungen von anorganischem Kalzium auffiel, ist zumindest zum Teil für die schlechten mechanischen und funktionellen Eigenschaften der GA-fixierten Klappen nach sechs Monaten verantwortlich.

Als Ursache für die o.g. Kalzifikation kommen mehrere Mechanismen in Frage: Erstens eine inflammatorische Reaktion auf das GA-fixierte Perikard. Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Kalzifikation darf als gesichert gelten. Als Trigger für die Inflammation kommen dabei sowohl Fremd-DNA/RNA und Zellreste im GA-fixierten Gewebe in Frage, als auch eine direkte pro-inflammatorische Wirkung von Glutaraldehyd-Resten. Jedoch ist zu bemerken, dass keine immunkompetenten Zellen in den Präparaten nachweisbar waren. Dies könnte durch die methodisch eingeschränkte Auswahl an entsprechenden Markern bedingt sein (Untersucht wurde nur auf CD3 und CD68) oder aber der entzündliche Prozess ist bereits abgelaufen und die Bilder zeigen nur das Resultat der Inflammation.

Zweitens ist auch eine direkte chemische Reaktion von anorganischem Kalzium und Glutaraldehyd-Resten ohne immunologische Beteiligung denkbar und aus der Literatur bekannt.

Die Degeneration tritt in dieser Arbeit bereits nach sechs Monaten deutlich auf, während ähnliche, ebenfalls GA-fixierte Materialien in biologischen Aortenklappenprothesen seit vielen Jahren eingesetzt werden. Dabei spielt der deutlich höhere Kalzium-Stoffwechsel der Empfängertiere eine Rolle, der die o. g. Verkalkungsprozesse massiv beschleunigt.

Hinzu kommt, dass die deutlich höheren Druck- und Flussbedingungen im arteriellen System die Beweglichkeit der Klappensegel trotz beginnender Verkalkung und Sklerose maskieren und erst deutlich später symptomatisch werden lassen. Im Umkehrschluss lassen die langsamen und niedrigeren venösen Fluss- und Druckbedingungen die pathologischen Umbauprozesse der GA-fixierten Klappen früher in Erscheinung treten, weil die Anforderungen an zarte Segel mit guter Beweglichkeit besonders hoch sind.

Bei den dezellularisierten Klappen zeigte sich hingegen auch nach sechs Monaten in vivo makroskopisch überwiegend eine völlig erhaltene Klappenfunktion mit gut beweglichen Klappensegeln. Dies erklärt auch die weiterhin nachweisbare deutliche Reduktion der IVC V-Welle (Tabelle 2).

Auch histologisch zeigte sich ein anderes Bild als bei den GA-fixierten Klappen. Von Kossa und Movat-Pentachrom zeigten einen homogenen Aufbau im Querschnitt und geben keine Hinweise auf pathologische Vorgänge oder Zellpopulationen. Ebenso die Immunhistochemie: Unter einer zarten Schicht Neoendothel konnte eine homogene Zellbesiedelung mit α -SMA positiven Zellen nachgewiesen werden.

Dort konnten sich die eingewanderten Zellen im gesamten Gewebsquerschnitt in der extrazellulären Matrix festsetzen.

Welcher der beiden Faktoren (geringere Kalzifikation oder bessere Rezellularisierung) für die bessere Funktionalität und Ergebnisse der dezellularisierten Klappen verantwortlich ist, kann dabei nicht mit endgültiger Sicherheit gesagt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass für die Ergebnisse nach sechs Monaten die Kalzifikation der bedeutendere Faktor ist, da davon auszugehen ist, dass die in der Kalzium-sensitiven Von Kossa-Färbung dargestellten großen, groben Verkalkungen sich besonders ungünstig auf die Beweglichkeit der Segel auswirken.

4.3 Limitationen der Arbeit

4.3.1 Pathophysiologische und anatomische Limitation des Modells

Eine Limitation des Tiermodells ist die gemischte Genese der erzeugten TI aus funktioneller (pulmonal-arterielle Hypertonie durch Banding) und struktureller (intrinsischer Klappenschaden durch Valvulotom) Ursache. Bei den klinischen Patienten hingegen überwiegen die funktionellen, chronischen Klappeninsuffizienzen.

Der damit zusammenhängende Unterschied in der rechtsventrikulären Pumpfunktion könnte bei der angestrebten klinischen Anwendung relevant sein:

Während die älteren, multimorbiden Patienten meist auch eine mittel- oder hochgradig eingeschränkte rechtsventrikuläre Funktion zeigen, weisen die Schafe des Tiermodells nach sechs Wochen Pulmonalbanding eine kompensierten rechtsventrikulären Insuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion auf. Die Frage, inwieweit eine plötzliche Erhöhung der Vor- und Nachlast des rechten Ventrikels durch die orthotope Klappenimplantation bei älteren Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion sinnvoll ist, kann das Tiermodell also nicht beantworten.

Auch die relativ geringe Zahl an Versuchstieren stellt eine Einschränkung für die statistische Aussagekraft dar. Dies ist vor allem den äußerst aufwendigen und invasiven chirurgischen Prozeduren und der ebenfalls aufwendigen Haltung von Großtieren geschuldet.

Die orthotope Position der Klappenprothese bewirkt im Falle einer hochgradigen TI eine funktionelle Ventrikularisierung des Vorhofs nach der Implantation. Dieser ist dann weiterhin erhöhtem Druck ausgesetzt. Weitere Dilatation und Remodelling sind möglich und erhöhen das Risiko z.B. für supraventrikuläre Herzrhythmusstörungen.

Eine weitere Limitation der orthotopen Klappenposition ist die Notwendigkeit eines Rückflusses bis in die zentralen Venen. Die eigene Compliance des rechten Vorhofs mindert bei einer TI den Rückfluss in die Hohlvenen und kann die Klappenfunktion beeinträchtigen. Ein präoperativer Nach-

weis eines Rück- oder Pendelfluss in den Hohlvenen ist somit für eine heterotope Implantation unerlässlich.

Hinzu kommt ein anatomischer Unterschied des Modells zur angestrebten klinischen Anwendung: Der Abstand von der Einmündung der Lebervenen bis zur Mündung der Vena cava inferior in den rechten Vorhof, welcher die gewünschte Implantationsstelle für die IVC Klappe darstellt, ist beim Menschen deutlich kürzer, nämlich statt 6-7cm beim jungen Schaf nur 3-4cm beim erwachsenen Menschen. Die korrekte Positionierung eines 50 mm langen Stents, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, ist somit möglicherweise schwieriger. Der Stent muss sich dann ggf. im RA entfalten und abstützen, die Klappe mit Perikardmanschette leicht in den RA hineinragen, was wiederum das Risiko für ein paravalvuläres Leck erhöht.

4.3.2 Limitation des Dezellularisierungsprotokolls

Für die Dezellularisierung von Homografts und xenogenen Geweben stehen in der aktuellen Literatur mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Das in dieser Arbeit verwendete Perikard wurde mit einem Tensid-basierten Protokoll dezellularisiert (siehe Kapitel 2). Eine mögliche Limitation sind hier Reste von Fremdprotein oder DNA/RNA-Reste, welche eine immunologische Reaktion des Empfängerorganismus triggern und so zu Inflammation und Degeneration der dezellularisierten Klappen beitragen könnte.

Enzym-basierte Dezellularisierungsprotokolle dagegen, die z.B. Trypsin oder RNAase enthalten, liefern zwar sehr Protein- und Fremd-DNA/RNA-freie Ergebnisse, haben jedoch einen entscheidenden Nachteil. Sie beschädigen auch die Basalmembran und beeinträchtigen damit die strukturelle Integrität des Materials, da auch ECM-Bestandteile wie Elastin, saure GAG und Laminin angegriffen werden.

Tensid-basierte Dezellularisierungsprotokolle dagegen, die z.B. SDS und TritonX-100 enthalten, liefern eine Dezellularisierung mit intakter Basalmembran. Dies hat nicht nur Konsequenzen für die mechanische Belastbarkeit des Materials nach der Implantation, sondern auch für die anschließende Rezellularisierung (s.u.).

Mögliche Nachteile sind zudem bisher in der Literatur kaum beleuchtete Fragen nach Residuen von Detergenzien nach Abschluss des Dezellularisierungsvorganges und deren Zytotoxizität.

4.4 Einordnung in die Literatur

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die Druck- und Flussbedingungen, denen eine Matrix ausgesetzt ist, die Qualität der Besiedelung mit körpereigenen Zellen beeinflusst.

Eine andere Arbeit zur Rezellularisierung (Lichtenberg, Cebotari et al. 2006) hat gezeigt, dass ein moderater pulsatile Blutfluss (wie im rechten Herz), in einem Bioreaktor in vitro die Zelleinwanderung von zirkulierenden Endothel- und Progenitorzellen und die Proliferation von ECM bei einer dezellularisierten ovinen Aortenklappe fördert.

Ein Anheben der Druck- und Flussverhältnisse auf physiologische arterielle Parameter danach führte hingegen zu signifikantem Schaden an der neu endothelialisierten Oberfläche sowie einem kompletten Verlust der Klappensegelbesiedlung.

Eine in vitro Besiedlung von dezellularisiertem Material mit autologen Zellen wirft also zumindest für die Verwendung im arteriellen System Probleme auf. Dies zeigte sich auch in den praktischen Erfahrungen bei klinischer Anwendung von dezellularisierten Aortenklappen (Bechtel, Muller-Steinhardt et al. 2003; Simon, Kasimir et al. 2003).

Es besteht die Möglichkeit, dass der Einsatz von dezellularisiertem Klappenmaterial speziell im venösen System einen besonders günstigen Effekt auf die Rezellularisierung hat und somit zu den besseren Ergebnissen dieses Materials im Vergleich beiträgt.

Darüber zeichnet sich in der aktuellen Literatur über Tissue-engineerte Herzklappenprothesen ab, dass biopolymer-basierte Herzklappenprothesen noch weit davon entfernt sind, die natürliche Zell- und ECM-Architektur mit der korrekten Anordnung der Proteine der ECM zu reproduzieren. Ein möglicher Grund sind auch an dieser Stelle die mechanischen Bedingungen, also Druck, Fluss und Pulsation im arteriellen Sys-

tem, welchen die Aortenklappe, die aktuell am intensivsten beforscht wird, ausgesetzt ist.

Denn unter sanfteren Druck- und Flussbedingungen hergestellte Klappen versagen beim Transfer auf höhere Drücke, sei es im Bioreaktor oder in vivo (Shinoka, Ma et al. 1996; Mendelson and Schoen 2006). Dezellularisierte biologische Gewebivorlagen aus Perikard haben ihr Potential aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften den Anforderungen des systemischen Blutdrucks zu widerstehen bereits gezeigt.

Entscheidend könnte dabei das verwendete Dezellularisierungsprotokoll sein. Unterschiedliche Dezellularisierungsprotokolle bringen sehr abweichende Ergebnisse. Ein hohes Maß an Reduktion von Spenderzellen, Proteinen und DNA wird mit einer starken Reduktion bestimmter Komponenten der ECM oder Basalmembran wie Elastin oder Laminin erkauft. Damit geht eine Verschlechterung ihrer biomechanischen Eigenschaften einher. Zudem könnte ein Verlust o.g. Strukturen auch Auswirkungen auf die Rezellularisierungsfähigkeit der Matrix haben.

Western-Blot Analysen haben gezeigt (Akhyari, Aubin et al. 2011), dass nach einem Tensid-basierten Dezellularisierungsprotokoll ein großer Teil von Laminin und Kollagen IV, zwei Komponenten der Basalmembran und ein vergleichbarer Elastinanteil weiterhin nachweisbar sind.

Die Tatsache, dass die biomechanischen Eigenschaften des dezellulierten Materials durch die Anwendung eines Tensid-basierten Dezellularisierungsprotokolls weitgehend erhalten werden, zeigt sich in den vergleichbaren hämodynamischen Ergebnissen direkt nach der Implantation (Tabelle 2): Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der V-Welle im Vergleich zu den GA-fixierten Klappen. Zudem konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass eine intakte Basalmembran mit ihren Liganden wie Kollagen IV, Laminin und Perlecan entscheidend zur Adhäsion von zirkulierenden Progenitorzellen beiträgt und von großer Wichtigkeit für eine stabile Verbindung von ECM und (Neo-) Endothelzellschicht ist (Gandaglia, Bagno et al. 2011).

Hier könnte sich die Verwendung von Tensid-basierter Dezellularisierung als Grund für die besseren Ergebnisse (Abschnitt 3) und die Unterschiede zu anderen Arbeiten erweisen.

4.5 Ausblick

Diese Arbeit kann nur einen kleinen Teil der Fragen klären, die mit den aufkommenden Möglichkeiten des Tissue-Engineering zur Herstellung haltbarer biologischer Herzklappenprothesen verbunden sind. Bei den in Frage kommenden Ausgangsmaterialien/Matrizen haben sich biologische Materialien wie dezellularisiertes Perikard in Studien besser bewährt als Gele oder Kunststoffe (Mendelson and Schoen 2006; Gandaglia, Bagno et al. 2011; Hulsman, Grun et al. 2012). Sie haben eine niedrigere Thrombogenität und ihre Struktur weist bessere Besiedlungskapazitäten auf. Außerdem sind sie für eine direkte Implantation in vivo geeignet, da sie selbst die mechanische Stabilität besitzen, um funktionsfähige Klappen zu bilden. Wohingegen artifizielle Matrizen wie Gele oder Polymere erst mühsam und teuer in vitro besiedelt werden müssen und dabei die Rezellulierung und der Neuaufbau von Gewebe bisher nur sehr beschränkt funktioniert. Zudem ist die mechanische Belastbarkeit von biologischen Gelen sehr begrenzt.

Dabei gilt es zu bedenken, dass die passiven mechanischen Eigenschaften von dezellularisiertem Perikard vor allem durch ECM-Komponenten wie Elastin und Glykosaminoglykane bestimmt werden. Hier bieten sich Dezellularisierungsprotokolle auf Tensid-Basis, wie das in dieser Arbeit verwendete, an, da sie die o. g. Strukturen weitgehend erhalten können.

Ob bei den biologischen Matrizen Klappenprothesen aus dezellularisiertem Perikard wie in dieser Untersuchung oder dezellularisierte native Klappen überlegen sind, müssen weitere Untersuchungen klären. Für die Perikardklappen spricht die, vor allem bei Verwendung von xenogenem Material, gute Verfügbarkeit, die einfache Größenanpassung sowie eine bessere mechanische Widerstandsfähigkeit.

Welches Material letztendlich in der Lage ist, eine ideale Herzklappenprothese zu liefern, kann mit dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden.

Im Hinblick auf die Anforderungen an eine „ideale“ Herzklappenprothese wies diese Arbeit bei den Klappenprothesen aus dezellularisiertem Perikard, vor allem in den Punkten hämodynamisches und funktionelles Outcome im Langzeitversuch, sowie Degeneration und Rezellularisierung im makro- und mikroskopischen Ergebnis eine Überlegenheit gegenüber den GA-fixierten Klappen nach.

Was die Besiedlung mit körpereigenen Zellen angeht, so ließen sich auch hier Vorteile zeigen. Ob die Rezellularisierung zur Defektreparatur oder Wachstum ausreichend ist und wie diese noch verbessert werden können, muss noch in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Es gilt zudem zu untersuchen, ob sich die Vorteile der dezellulisierten Materialien auch in anderen Anwendungen wie dem perkutanen Aortenklappenersatz aus dezellularisiertem Perikard übertragen lassen. Vergleichbare Arbeiten unterscheiden sich von der hier vorliegenden vor allem dadurch, dass zum Einbringen der Klappen in den Empfänger-Organismus ein chirurgisches und kein perkutanes Verfahren benutzt wurde. Weiterhin wurde in dieser Arbeit Perikard speziesübergreifend (bovin-ovin) eingesetzt, während andere Arbeiten sich überwiegend auf native Klappen der gleichen Spezies (ovin-ovin) beschränken.

In einem Tiermodell zur TI gemischter Genese zeigen orthotop implantierte Perikardklappen eine deutliche Reduktion der V-Welle distal der Klappen. Die Implantation ist dabei mit einem perkutanen Zugang ohne großes chirurgisches Trauma oder extrakorporale Zirkulation möglich. Es konnte mit dem orthotopen Trikuspidalklappenersatz eine effektive und sichere Therapie für ältere, multimorbide Patienten mit hohem operativem Risiko geschaffen werden. Trotz des vergleichsweise geringen Stellenwertes der interventionellen Therapie der Trikuspidalklappe könnte sie zukünftig dazu beitragen, die steigenden Gesamtkosten des Gesundheitssystems aufgrund der demographischen Entwicklung und der proportional zunehmenden kardiovaskulären Morbidität zu begrenzen. Bei der Verwendung von

dezellularisiertem Perikard konnte im hier vorgestellten Tiermodell eine Überlegenheit in Hämodynamik, funktionellem Outcome und Degenerationsanfälligkeit gezeigt werden. Eine typische Limitation der verbreitet verwendeten GA-fixierten Bioprothesen konnte nach weiterer Evaluation des Materials damit überwunden werden.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Anzahl und Aufbereitung der Proben je Versuchstier | 26 |
| Tabelle 2: Hämodynamische Parameter während der Versuche | 32 |
| | |
| Abbildung 1: V-Welle in der Invasivdiagnostik | 9 |
| Abbildung 2: Herzklappeneingriffe in Deutschland | 12 |
| Abbildung 3: Schritte zum Aufbau der Klappe | 19 |
| Abbildung 4: Perikardmanschette und fertige Klappe im Stent | 20 |
| Abbildung 5: Studiendesign mit zeitlichem Ablauf | 21 |
| Abbildung 6: Makroskopische Bilder nach sechs Monaten in vivo | 33 |
| Abbildung 7: Von Kossa-Färbungen der Klappen | 34 |
| Abbildung 8: Movat-Pentachrom-Färbungen der Klappen | 36 |
| Abbildung 9: Immunhistologie der Klappen | 38 |
| Abbildung 10: Vergleich der Endothel-Schicht im SEM-Bild | 39 |
| Abbildung 11: Thrombotisches Material auf GA-fixierten Klappen | 39 |

6 Literaturverzeichnis

- Akhyari, P., H. Aubin, et al. (2011). "The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities." Tissue Eng Part C Methods **17**(9): 915-926.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.
- Bechtel, J. F., M. Muller-Steinhardt, et al. (2003). "Evaluation of the decellularized pulmonary valve homograft (SynerGraft)." J Heart Valve Dis **12**(6): 734-739; discussion 739-740.
- Beckmann, A., A. K. Funkat, et al. (2014). "Cardiac surgery in Germany during 2012: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." Thorac Cardiovasc Surg **62**(1): 5-17.
- Bernal, J. M., D. Morales, et al. (2005). "Reoperations after tricuspid valve repair." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(2): 498-503.
- Boudjemline, Y., G. Agnoletti, et al. (2005). "Steps toward the percutaneous replacement of atrioventricular valves an experimental study." J Am Coll Cardiol **46**(2): 360-365.
- Carpentier, A. (1983). "Cardiac valve surgery--the "French correction"." J Thorac Cardiovasc Surg **86**(3): 323-337.
- Carpentier, A., G. Lemaigre, et al. (1969). "Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts." J Thorac Cardiovasc Surg **58**(4): 467-483.
- Cebotari, S., A. Lichtenberg, et al. (2006). "Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells." Circulation **114**(1 Suppl): I132-137.
- Chauvaud, S. (2000). "Ebstein's malformation. surgical treatment and results." Thorac Cardiovasc Surg **48**(4): 220-223.
- Dahm, M., W. D. Lyman, et al. (1990). "Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium." J Thorac Cardiovasc Surg **99**(6): 1082-1090.
- Daniel, W. G. (2006). "Klappenvitien im Erwachsenenalter." Clin Res Cardiol **95**: 620-641.
- Dreyfus, G. D., P. J. Corbi, et al. (2005). "Secondary tricuspid regurgitation or dilatation: which should be the criteria for surgical repair?" Ann Thorac Surg **79**(1): 127-132.
- Erdmann, E. (1975-2009). *Klinische Kardiologie*.
- Flachskampf, F. A. (2007). *Praxis der Echokardiographie*, Georg Thieme Verlag KG: 169.
- Fukuda, S., G. Saracino, et al. (2006). "Three-dimensional geometry of the tricuspid annulus in healthy subjects and in patients with functional tricuspid regurgitation: a real-time, 3-dimensional echocardiographic study." Circulation **114**(1 Suppl): I492-498.
- Funkat, A., A. Beckmann, et al. (2014). "Cardiac Surgery in Germany during 2013: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." Thorac Cardiovasc Surg.
- Funkat, A. K., A. Beckmann, et al. (2012). "Cardiac surgery in Germany during 2011: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." Thorac Cardiovasc Surg **60**(6): 371-382.
- Gandaglia, A., A. Bagno, et al. (2011). "Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations." Eur J Cardiothorac Surg **39**(4): 523-531.

- Gummert, J. F., A. Funkat, et al. (2010). "Cardiac surgery in Germany during 2009. A report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." *Thorac Cardiovasc Surg* **58**(7): 379-386.
- Gummert, J. F., A. K. Funkat, et al. (2011). "Cardiac surgery in Germany during 2010: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." *Thorac Cardiovasc Surg* **59**(5): 259-267.
- Hulsmann, J., K. Grun, et al. (2012). "Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing." *Xenotransplantation* **19**(5): 286-297.
- Hust, M. H. (2000). Transösophageale Echo- und Doppler - Echokardiographie. R.Ebel, Novartis: 54
- Karim, N., K. Golz, et al. (2006). "The cardiovascular tissue-reactor: a novel device for the engineering of heart valves." *Artif Organs* **30**(10): 809-814.
- Khoo, C. W., S. Krishnamoorthy, et al. (2010). "Assessment of left atrial volume: a focus on echocardiographic methods and clinical implications." *Clin Res Cardiol*.
- King, R. M., H. V. Schaff, et al. (1984). "Surgery for tricuspid regurgitation late after mitral valve replacement." *Circulation* **70**(3 Pt 2): 1193-1197.
- Lauten, A., M. Ferrari, et al. (2011). "Heterotopic transcatheter tricuspid valve implantation: first-in-man application of a novel approach to tricuspid regurgitation." *Eur Heart J* **32**(10): 1207-1213.
- Lauten, A., H. R. Figulla, et al. (2010). "Percutaneous caval stent valve implantation: investigation of an interventional approach for treatment of tricuspid regurgitation." *Eur Heart J* **31**(10): 1274-1281.
- Liao, K., R. W. Frater, et al. (1995). "Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts." *Ann Thorac Surg* **60**(2 Suppl): S343-347.
- Lichtenberg, A., S. Cebotari, et al. (2006). "Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves." *J Heart Valve Dis* **15**(2): 287-293; discussion 293-284.
- Lichtenberg, A., I. Tudorache, et al. (2006). "In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions." *Biomaterials* **27**(23): 4221-4229.
- Luisada, A. A., A. Singhal, et al. (1984). "Diagnosis of tricuspid insufficiency by non invasive methods." *Angiology* **35**(3): 139-147.
- Mendelson, K. and F. J. Schoen (2006). "Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges." *Ann Biomed Eng* **34**(12): 1799-1819.
- Movat, H. Z. (1955). "Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains." *AMA Arch Pathol* **60**(3): 289-295.
- Nagamoto, T., G. Eguchi, et al. (2000). "Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(5): 1122-1129.
- Nath, J., E. Foster, et al. (2004). "Impact of tricuspid regurgitation on long-term survival." *J Am Coll Cardiol* **43**(3): 405-409.
- Nienaber, C. A., R. Fattori, et al. (1999). "Nonsurgical reconstruction of thoracic aortic dissection by stent-graft placement." *N Engl J Med* **340**(20): 1539-1545.
- Pellegrini, A., T. Colombo, et al. (1992). "Evaluation and treatment of secondary tricuspid insufficiency." *Eur J Cardiothorac Surg* **6**(6): 288-296.
- Puchtler, H. and S. N. Meloan (1978). "Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction." *Histochemistry* **56**(3-4): 177-185.
- Rogers, J. H. and S. F. Bolling (2009). "The tricuspid valve: current perspective and evolving management of tricuspid regurgitation." *Circulation* **119**(20): 2718-2725.

- Sadler, J. E. (1998). "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." Annu Rev Biochem **67**: 395-424.
- Schmidt, D., A. Mol, et al. (2007). "In vitro heart valve tissue engineering." Methods Mol Med **140**: 319-330.
- Schneider, D. B. and D. A. Dichek (1997). "Intravascular stent endothelialization. A goal worth pursuing?" Circulation **95**(2): 308-310.
- Shinoka, T., P. X. Ma, et al. (1996). "Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model." Circulation **94**(9 Suppl): II164-168.
- Shiran, A. and A. Sagie (2009). "Tricuspid regurgitation in mitral valve disease incidence, prognostic implications, mechanism, and management." J Am Coll Cardiol **53**(5): 401-408.
- Simon, P., M. T. Kasimir, et al. (2003). "Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients." Eur J Cardiothorac Surg **23**(6): 1002-1006; discussion 1006.
- Simon, R., H. Oelert, et al. (1980). "Influence of mitral valve surgery on tricuspid incompetence concomitant with mitral valve disease." Circulation **62**(2 Pt 2): I152-157.
- Singh, J. P., J. C. Evans, et al. (1999). "Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study)." Am J Cardiol **83**(6): 897-902.
- Southern, L. J., H. Hughes, et al. (2000). "Glutaraldehyde-induced cross-links: a study of model compounds and commercial bioprosthetic valves." J Heart Valve Dis **9**(2): 241-248; discussion 248-249.
- Spyridopoulos, I. (2006). Kardiologie compact: Alles für Station und Facharztprüfung.
- Tei, C., J. P. Pilgrim, et al. (1982). "The tricuspid valve annulus: study of size and motion in normal subjects and in patients with tricuspid regurgitation." Circulation **66**(3): 665-671.
- Topol, E. (1994). Textbook of interventional Cardiology, Saunders Company.
- Vahanian, A., O. Alfieri, et al. (2012). "Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)." Eur J Cardiothorac Surg **42**(4): S1-44.
- Vahanian, A. and B. Iung (2012). "The new ESC/EACTS guidelines on the management of valvular heart disease." Arch Cardiovasc Dis **105**(10): 465-467.
- Waller, B. F., A. T. Moriarty, et al. (1986). "Etiology of pure tricuspid regurgitation based on anular circumference and leaflet area: analysis of 45 necropsy patients with clinical and morphologic evidence of pure tricuspid regurgitation." J Am Coll Cardiol **7**(5): 1063-1074.

Anhang

Anhang A: Zahlen zur Abbildung 2 (Gummert, Funkat et al. 2010; Gummert, Funkat et al. 2011; Funkat, Beckmann et al. 2012).

| Operative Herzklappenbehandlungen in Deutschland | 2009 | 2010 | 2011 |
|--|-------|-------|-------|
| Aortenklappe | 25203 | 26208 | 28295 |
| Mitralklappe | 11446 | 11873 | 12302 |
| Trikuspidalklappe | 2075 | 1961 | 2436 |

Anhang B: Herstellung der Lösung für Von Kossa-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung:

| | |
|--------------------------|---|
| Von Kossa-Färbung | <ul style="list-style-type: none"> • <u>1% flüssige Silbernitrat Lösung</u> - 1g Silbernitrat - 100ml Aqua dest. • <u>5% Natrium Thiosulfat</u> - 5g Natrium Thiosulfat - 100ml Aqua dest. • <u>0,1% Nuclear Fast Red Solution</u> - 0,1g Nuclear Fast Red - 5g Aluminum Sulfat - 100ml Aqua dest. |
| Movat-Pentachrom | <u>Alkalischer Alkohol</u> <ul style="list-style-type: none"> - 10ml Ammoniak 25%ig - 100ml 96%iges Ethanol <u>Alcianblau-Lösung</u> <ul style="list-style-type: none"> - 1g Alcianblau - 1ml Eisessig - 100ml Aqua-bidest <u>Saffron du Gatinais</u> <ul style="list-style-type: none"> - 6g Saffran ad 100ml Ethanol 100% |

Movat-Pentachrom

Brilliant Crocein-Säurefuchsin

Lösung A: 0,1g Brilliant Crocein R in 0,5ml Eisessig ad 100ml Aqua-bidest

Lösung B: 0,1g Säurefuchsin in 0,5ml Eisessig ad 100ml Aqua-bidest

Lösungen A:B 4:1

Weigerts Eisenhämatoxylin

Lösung A: 1g Hämatoxylin ad 100ml Aqua-bidest

Lösung B: 1,16g Eisen-3-Chlorid +1ml 25%igSalzsäure ad 100ml Aqua-bidest

Lösungen A:B 1:1

Danksagung

In meinen Dank möchte ich alle einschließen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. med. habil. Alexander Lauten, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand. Besonders danken möchte ich ihm für die breite Veröffentlichung der Ergebnisse in international anerkannten Fachzeitschriften. Mein außerordentlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Hans Reiner Figulla für das Ermöglichen der Rahmenbedingungen der Versuche.

Ebenfalls danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Harald Schubert und Frau Dr. med. vet. Sabine Bischoff vom Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die hervorragende Unterstützung bei den Tierversuchen sowie Frau Annett Schmidt für die geduldige Unterstützung beim Anfertigen der Herzklappenprothesen.

Ebenfalls in meinen Dank einschließen möchte die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Akhyari von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung, sowie Herrn Sandor Nitsche vom Elektronenmikroskopischen Zentrum Jena für die Hilfe bei den SEM-Bildern.

Abschließend richte ich einen besonderen Dank an meine Familie, ihr sei diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Adrian Laube

| | |
|-----------------------|--|
| 27.05.1987 | geboren in Suhl, Thüringen, Deutschland |
| 1997-2005 | Ernst-Abbe-Gymnasium Eisenach, Abitur |
| 2005-2011 | Humanmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der medizinischen Universität Innsbruck |
| 29.11.2011 | zweiter Abschnitt ärztliche Prüfung, Note „gut“, Gesamtnote „gut“ |
| 01.04.2012-30.04.2013 | Assistenzarzt Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena, Prof. Dr. H.R. Figulla |
| Seit 15.10.2013 | Assistenzarzt Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Elblandklinikum Radebeul |

Dresden, 11.11.2014

Adrian Laube

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr PD Dr.med. habil. Alexander Lauten als betreuender Hochschullehrer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, 11.11.2014

Adrian Laube